

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Estrategias Biológicas en el Área Farmacéutica

**“Influencia de la administración de bifidobacterias y prebióticos en la inducción de
nódulos en un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

IBT. Juan Cervantes Naranjo

MATRÍCULA

2161800551

COMITÉ TUTORIAL

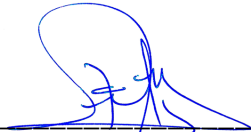
Cotutor: Dra. María Angélica Gutiérrez Nava (UAM-X)

Cotutor: Dr. Julio Isael Pérez Carreón (INMEGEN)

Asesor: M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña (UAM-X)

Influencia de la administración de bifidobacterias y prebióticos en la inducción de nódulos en un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata

Visto bueno (Vo.Bo) del Comité Tutoral



Cotutor: Dra. María Angélica Gutiérrez Nava (UAM-X)



Cotutor: Dr. Julio Isael Pérez Carreón (INMEGEN)



Asesor: M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña (UAM-X)

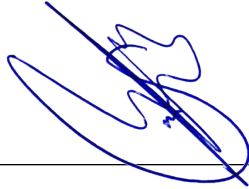


Juan Cervantes Naranjo

Matricula: 2161800551

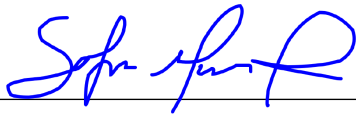
**Influencia de la administración de bifidobacterias y prebióticos en la inducción de
nódulos en un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata**

Jurado del Examen de Grado



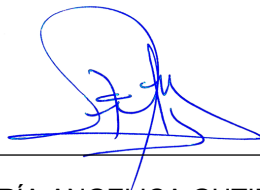
DR. JAIME ARELLANES ROBLEDO (INMEGEN)

Presidente



DRA. SOFIA MORAN RAMOS (UNAM)

Vocal



DRA. MARÍA ANGELICA GUTIÉRREZ NAVA

Secretaria

Resumen

Debido a que el hígado está en comunicación directa con el intestino mediante el sistema de la vena porta, que suministra el 75 % de la sangre total que recibe, el microambiente generado por probióticos puede representar una ventana de tratamientos o profilaxis para las enfermedades crónicas como el carcinoma hepatocelular. En este trabajo se estudió el efecto de la administración de un simbiótico: probiótico *Bifidobacterium* sp., en combinación con el prebiótico inulina, en un modelo de hepatocarcinogénesis química en ratas Wistar. Los animales se distribuyeron en 8 grupos, 4 administrados con probiótico, prebiótico, simbiótico y un control negativo y otros 3 grupos con las mismas características más la administración del carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) y un grupo administrado solo con DEN llamado control positivo. El tratamiento se llevó a cabo durante 16 semanas para inducir la formación de nódulos cancerosos en el hígado de la rata seguido de dos semanas de descanso. Durante los esquemas de administración el peso corporal de los animales administrados con DEN disminuyó en un promedio del 8 % del peso sin presentar una diferencia estadística. Los hígados extraídos del grupo tratado con DEN presentaron hepatomegalia y; la cantidad de nódulos superiores a 1 mm² detectados mediante el marcador tumoral gamma glutamil transferasa (GGT), fue significativamente menor en el grupo que fue administrado con simbiótico más DEN comparado con el grupo, control positivo ($p = 0.012$), así como el promedio del tamaño de los nódulos superiores a 1mm² en los mismos grupos con un valor de $p = 0.004$. La tinción tricrómica de Masson mostró que la acumulación de tejido conjuntivo en los grupos con tratamiento (probiótico, prebiótico y simbiótico) y administrados con DEN, fue menor que en el control positivo. Con la tinción de hematoxilina-eosina se observó que en los grupos administrados con DEN se irrumpe el parénquima hepático donde y aquel que se administró con simbiótico más DEN fue el menos afectado. Nuestros resultados demuestran que el uso de *Bifidobacterium* sp. e inulina previenen el desarrollo del carcinoma hepatocelular debido a que se observó una disminución del tamaño de los nódulos en un 85 % con un valor de $p = 0.004$, así como el porcentaje total de

área alterada que disminuyó un 36 % con el tratamiento simbiótico en comparación del control positivo. Este trabajo abre una gama de posibilidades para estudiar los efectos de las bifidobacterias como potencial tratamiento o prevención de enfermedades hepáticas como el carcinoma hepatocelular.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por brindarme el apoyo económico para mis estudios de maestría.

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) por aceptarme como estudiante de esta institución.

Agradezco al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por el apoyo en los análisis requeridos para la elaboración de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco mucho a mis compañeros de maestría, Carlos Solís, Guillermo Romero, Norberto Vázquez con quienes compartí muchas experiencias y me apoyaron en el desarrollo de este trabajo, agradezco también a mis compañeras del laboratorio de Ecología Microbiana Mariana, Zak, Vane, Jeny y Michael que más que compañeros fueron como una familia extra, que siempre estuvieron apoyándome y me llevo una agradable experiencia, así como mucho aprendizaje.

Agradezco a mis amigos Luis Alfonso y José por los momentos que me alentaron en no abandonar y terminar este trabajo.

Agradezco también al Dr. Martín por su apoyo, así como a mis sinodales la Dra. Sofia Moran y el Dr. Jaime Arellanes por tomarse el tiempo de leer este trabajo, y de sus observaciones.

Por último, a mis tutores la Ma. Marcela Hurtado, el Dr. Julio Pérez por incluirme en su lugar de trabajo así como el aprendizaje que me llevo de sus enseñanzas y de su siempre apoyo.

En especial quisiera agradecer a la Dra. María Angelica Gutiérrez Nava por aceptarme como su tutorado, sin saber en los problemas en los que estaba por tener, pero sobre todo la paciencia, consejos y muchas enseñanzas que muchas fueron parte de mi desarrollo profesional y otras de mi desarrollo personal.

Gracias.

Contenido

Resumen	4
Introducción	10
Marco Teórico	13
El hígado	13
Funciones del hígado	14
Carcinoma Hepatocelular	14
Factores de riesgo	15
Historia natural de la enfermedad hepática crónica	15
Tratamientos para carcinoma hepatocelular	17
Eje hígado-intestino	18
Probióticos	19
Probióticos y enfermedades del hígado	19
Mecanismos de protección mediados por probióticos ante el cáncer	21
Género <i>Bifidobacterium</i>	23
Prebióticos	25
Efectos benéficos de los prebióticos	26
Inulina	27
Complejo Simbiótico	28
Modelos Experimentales	29
El modelo animal de hepatocarcinogénesis de Schiffer	30
Gamma glutamil transferasa	31
Técnicas histológicas	32
Tinción de hematoxilina-eosina	32
Tinción tricrómica de Masson	33
Planteamiento del problema	35
Hipótesis	35
Objetivo general	36
Objetivos particulares	36
Metodología	37
Microorganismo, medio y condiciones de cultivo	37
Preparación de las bacterias para administrar	37
Viabilidad de <i>Bifidobacterium sp.</i>	38
Tratamiento experimental en animales de laboratorio	38
Obtención muestras	40

Histoquímica de GGT	41
Hematoxilina y eosina	41
Tricrómica de Masson	41
Análisis estadístico	42
Resultados	43
Crecimiento bacteriano	43
Tratamiento experimental en animales de laboratorio	44
Control de peso semanal de los grupos experimentales	45
Observación macroscópica de los hígados	48
Relación del peso del hígado en relación con el peso de los animales	50
Histoquímica de la gamma glutamil transferasa	52
Tinción de Masson	62
Discusión	65
Conclusiones	68
Bibliografía	69

Introducción

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo, ya que representa el 2 % del peso corporal, que es aproximadamente alrededor de 1.5 kg en un adulto (Guyton, 2011). Este órgano recibe el suministro de sangre de dos fuentes principales, la vena portal que suministra el 80 % de la sangre rica en nutrientes provenientes del intestino y la arteria hepática que suministra el 20 % restante con sangre oxigenada (Sibulesky, 2013). El sistema portal es muy importante, debido a que en la superficie de la luz intestinal se acumulan más de 40 trillones de bacterias. En conjunto, los microorganismos del intestino agregan en promedio 600000 genes a cada ser humano (WGO, 2017), lo que nos lleva a pensar que la microbiota intestinal tiene un papel importante en la homeostasis.

Dentro de esos billones de microorganismos podemos encontrar un grupo de bacterias que cuando se administran en cantidades adecuadas, ejercen un efecto benéfico a la salud del hospedero, el nombre de estas bacterias es probióticos. Las principales bacterias probióticas utilizadas son aquellas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Backhed, 2012).

En recientes décadas se ha estudiado el papel de los probióticos ante las enfermedades hepáticas, como el hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) y cirrosis, donde algunos experimentos muestran una disminución de la concentración de marcadores moleculares de daño hepático como, las enzimas alanino transferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y gamma glutamil transferasa (GGT); así como también, se ha observado una disminución de los niveles séricos de endotoxinas (Lata *et al.*, 2007; Aller *et al.*, 2011; Malaguanera *et al.*, 2012). Estas enfermedades incluyendo la fibrosis, son estadios previos a la aparición del carcinoma hepatocelular (CHC), una enfermedad que ocupa el cuarto lugar como causa de muerte por cáncer a nivel mundial (GLOBOCAN, 2018).

El tema es de especial interés, debido a que la detección del CHC se presenta en etapas avanzadas, en las que los tratamientos no suelen tener pronósticos buenos,

por lo que se han estudiado métodos y técnicas para la detección temprana y prevención del CHC. Se han estudiado los efectos benéficos que ejercen los probióticos y la relación directa que tiene el microambiente creado por estas bacterias en el hígado. Por lo que, en el presente proyecto, se evaluó el efecto del tratamiento con un simbiótico (probiótico-prebiótico) en un modelo animal de hepatocarcinogénesis química, con el apoyo de técnicas histopatológicas como la de hematoxilina-eosina y la tricrómica de Masson, así como de marcadores de daño hepático, para obtener datos cuantitativos que permitan determinar la influencia del tratamiento simbiótico en el desarrollo del CHC.

Antecedentes directos

Dentro del laboratorio de Ecología Microbiana perteneciente a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, en colaboración con el Laboratorio de Enfermedades Hepáticas del INMEGEN, se estudia el efecto de la administración de probióticos en modelos de hepatocarcinogénesis química en ratas Wistar, en los que se ha observado que al administrar diferentes concentraciones de *Bifidobacterium* sp. (1×10^6 , 1×10^9 y 1×10^{10} UFC) se tiene una influencia en el daño causado por el carcinógeno dietilnitrosamina (DEN), donde se observó una disminución de las lesiones macroscópicas en tejido hepático así como el número de nódulos y dimensiones de éstos, y como resultado las lesiones generadas fueron más pequeñas, así mismo se ha observado una disminución del número de focos GGT positivos y una variación en la expresión de genes involucrados en el proceso de inflamación $Tnf \alpha$, *Ptgs 2* e *Ilb 1* (Limeta, 2017; Martínez, 2017).

Marco Teórico

El hígado

Es el órgano más voluminoso del cuerpo y representa el 2 % del peso corporal total, es decir, alrededor de 1.5 kg para un adulto. Su unidad funcional básica es el lobulillo hepático, una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 mm de diámetro. El hígado humano contiene entre 50,000 y 100,000 lobulillos, que son estructuras de forma hexagonal que consisten en filas de hepatocitos que irradian desde una vena central. Dentro de los lobulillos existen vénulas portales que reciben, sobre todo, la sangre venosa del tubo digestivo a través de la vena porta; el dominio apical de los hepatocitos es adyacente a la triada portal conformada por la arteria hepática, el conducto biliar y la vena porta (Figura 1). La vena porta que aporta la mayor parte de la sangre que recibe el hígado luego drena en la vena central y se transporta fuera del hígado (Sibulesky, 2011; Marieb & Hoehn, 2013).

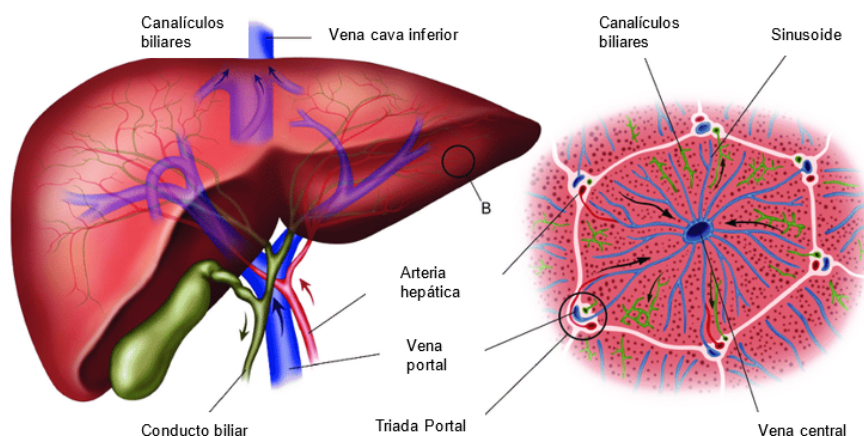


Figura 1.- Estructura del parénquima hepático. En esta figura se observa un lobulillo hepático, la composición de la triada portal conformada por la arteria hepática, la vena portal y el ducto biliar; los sinusoides hepáticos y la forma en racimos que presentan los hepatocitos.

Fuente: Oie *et al.*, 2018

Funciones del hígado

El hígado es un órgano que desempeña funciones de gran importancia en el metabolismo del cuerpo humano, además de mantener la homeostasis. De acuerdo con Guyton (2011), de las funciones que realiza podemos enlistar las siguientes:

- Metabolismo de hidratos de carbono
- Metabolismo de grasas
- Metabolismo de proteínas
- Almacenamiento de vitaminas
- Depósito de hierro en forma de ferritina
- Producción de proteínas para la coagulación de la sangre
- Eliminación o depuración de medicamentos

Debido a la diversidad de funciones que desempeña este órgano, es susceptible a sufrir daño, ya que está expuesto a diversos factores que lo afectan, como son: infecciones virales, exposición a aflotoxinas contenidas en alimentos mal almacenados, metabolismo de fármacos, consumo excesivo de alcohol etc. Estos factores desencadenan un daño a la estructura de las células hepáticas, lo que conduce a la pérdida de sus funciones y por consiguiente al surgimiento de diferentes tipos de enfermedades crónicas, tales como esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis, cirrosis y en etapas muy avanzadas desarrolla el CHC (Kumar *et al.*, 2010; Pellicoro *et al.*, 2014).

Carcinoma Hepatocelular

El CHC es el quinto cáncer más común y la cuarta causa de mortalidad relacionada con el cáncer a nivel mundial, es la principal causa de muerte relacionada con el hígado en todo el mundo, como resultado fue el cuarto lugar en índice de mortalidad

con un total de 781,631 defunciones durante el 2018 (Globocan, 2018). En México el CHC se ubica en cuarto lugar de muertes después del cáncer de colon, próstata y mama, con un número de muertes de 6,868, al año donde se observa un mayor índice dentro de la población masculina (Globocan, 2018). Los pacientes con CHC tienen un mal pronóstico a pesar de los logros en las técnicas de cirugía y otros procedimientos terapéuticos.

El CHC se desarrolla por daño crónico al hígado, debido a los procesos inflamatorios y regenerativos provocados por alguno de los factores que lo causan y al que esté expuesto, lo que contribuye a que se desarrolle un proceso de cáncer cuyas etapas son la iniciación, promoción y progresión. De todos los casos de CHC, entre el ochenta y el noventa por ciento, están relacionados con cirrosis o fibrosis y con factores de riesgo bien reconocidos, como son las infecciones por el virus de la hepatitis B, hepatitis C, cirrosis alcohólica y la hemocromatosis (White *et al.*, 2016).

Todos estos datos sugieren la búsqueda de alternativas para la prevención o tratamientos con pronósticos más alentadores a los actuales para combatir el CHC.

Factores de riesgo

Los factores de riesgo más comunes en desarrollar fibrosis, cirrosis hasta generar CHC son: la infección crónica con el virus de la hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), aflotoxinas, NASH, obesidad, consumo de alcohol y diabetes mellitus. Estos pacientes tienen dos veces más posibilidades de desarrollar CHC en comparación con personas sanas (Polesel *et al*, 2009; Ascha *et al*, 2010)

Historia natural de la enfermedad hepática crónica

Independientemente del origen del factor que daña al hígado, una constante exposición al factor causa una lesión iterativa que produce el inicio de un proceso inflamatorio; así como también, un excesivo depósito de proteínas de matriz

extracelular, que distorsionan la arquitectura del parénquima hepático, lo que lleva a la muerte de células parenquimatosas y a la angiogénesis.

Lo anterior conduce a un estado de fibrosis progresiva, en la que se encuentra una disrupción de la arquitectura y una generación aberrante de hepatocitos, que lleva a generar a una etapa final conocida como cirrosis, que es caracterizada por la hipertensión portal y un excesivo tejido de cicatriz. Algunos hepatocitos afectados confinados en nódulos pierden su control del ciclo celular con un crecimiento descontrolado que forma el CHC (figura 2).

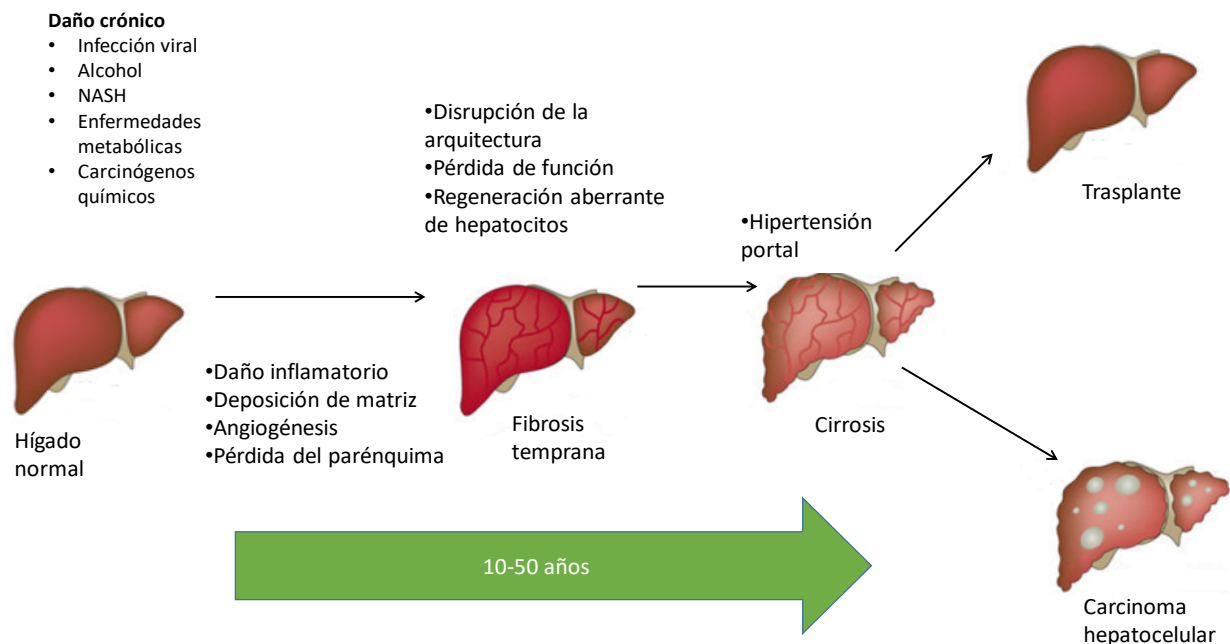


Figura 2. Esquema del daño crónico en hígado (Pellicoro *et al.*, 2014). El hígado al estar en contacto iterativo con algún factor de daño crónico sufre un proceso de inflamación constante que con el paso del tiempo se transforma en cirrosis y en algunos casos desarrolla carcinoma hepatocelular.

El proceso de hepatocarcinogénesis es lento y depende del daño que el hígado recibe, el cual puede tardar de 10 a 50 años, en consecuencia, el pronóstico no suele ser alentador y prácticamente más del 95 % de los pacientes mueren a causa

de este padecimiento. Este cáncer se encuentra dentro de los principales tipos y ocasiona tantas muertes como el cáncer de mama o próstata (Nava, 2017). Actualmente el trasplante de hígado es el único tratamiento disponible para la insuficiencia hepática o para algunos casos de hepatocarcinoma (Pellicoro *et al.*, 2014).

Tratamientos para carcinoma hepatocelular

Las opciones y recomendaciones de tratamiento actuales dependen de varios factores como el porcentaje de hígado afectado por el cáncer, la diseminación del cáncer, el daño en el área restante del hígado sin cáncer, las preferencias del paciente y su estado de salud en general.

Los tratamientos actuales, de acuerdo con ESMO (2014), son los siguientes:

- Cirugía
- Ablación por radiofrecuencia (RFA)
- Inyección percutánea de etanol
- Radioterapia
- Tratamientos dirigidos
- Quimioembolización
- Terapia dirigida
- Inmunoterapia

Actualmente no hay opciones terapéuticas para la prevención del cáncer de hígado, sin embargo, es importante hacer conciencia en la población sobre acciones para reducir la exposición a los factores de riesgo, como mejorar la alimentación, ya que el 90 % de los nutrientes que consumimos llegan directamente al hígado, por lo que se recomienda consumir mayor cantidad de fibras y vegetales, reducir el consumo de productos con exceso de grasa, reducir el consumo de alcohol, evitar el

sobrepeso, practicar ejercicio y prevenir la contaminación de granos con aflatoxinas (Secretaría de Salud, 2017). En consecuencia, el estudio del eje hígado-intestino representa un objetivo prometedor para los enfoques preventivos.

Eje hígado-intestino

El intestino posee la superficie de revestimiento epitelial más grande del cuerpo y funciona como una interfaz entre el medio externo y el medio interno del organismo (Fasano & Shea, 2005). Esta interfaz se encuentra en relación directa con el hígado mediante el sistema de la vena porta (figura 3).

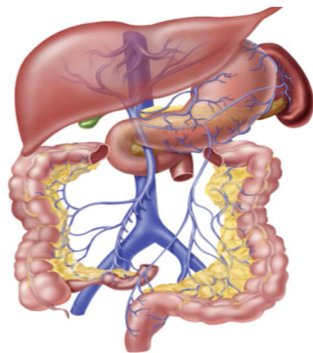


Figura 3.- Eje hígado-intestino a través del sistema portal.

Dentro del tracto gastrointestinal se alberga un alto y diverso número de microorganismos diferentes conocidos como microbiota intestinal. Bacterias, archeas, hongos, protozoos y los virus cohabitan e interactúan entre sí con el huésped, en particular con células epiteliales e inmunes. Poblaciones de microorganismos intestinales han logrado una configuración más o menos definida durante la evolución humana, lo que ha facilitado el establecimiento de su relación mutualista con el huésped (Sánchez *et al.*, 2017).

El número y la diversidad microbiana ha llamado la atención de algunos investigadores que consideran este microambiente como un órgano metabólico, un complejo sistema que participa en producción de vitaminas, degradación de los ácidos biliares, digestión de nutrientes, inmunidad y junto con la mucosa intestinal forma una barrera importante contra los patógenos (Abt & Artis, 2009). Este microambiente intestinal se puede modificar por la administración de probióticos y parece jugar un papel importante en el porvenir del desarrollo del daño hepático.

Probióticos

Los probióticos son definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico a la salud del hospedero (Hill *et al.*, 2014). Los mecanismos por medio de los cuales ejercen sus beneficios aún no están completamente estudiados; sin embargo, se han descrito los siguientes beneficios: impiden el crecimiento y la unión de bacterias patógenas, mejoran la función de la barrera intestinal, modulan el sistema inmune, inducen citocinas como IL-10 y TGF-beta y suprimen la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF (Yan *et al.*, 2007; Rousseaux *et al.*, 2007; Jones and Versalovic, 2009).

Probióticos y enfermedades del hígado

Los probióticos se han propuesto como una opción de tratamiento en enfermedades hepáticas por su efecto modulador sobre la microbiota intestinal. En un modelo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) con roedores, el uso de probióticos tuvo efectos benéficos, ya que mejoró el cuadro histológico de daño al parénquima hepático (Ma *et al.*, 2018; Esposito *et al.*, 2009).

También se ha reportado la prevención y la mejora de los tratamientos de hígado graso, mediante la administración de una mezcla de probióticos como el llamado

VSL#3 (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) en un modelo de ratón con una dieta deficiente de metil-colina (Valeyudham *et al.*, 2009).

Varios trabajos sostienen la hipótesis de que la manipulación de la microbiota intestinal puede contrarrestar los efectos en enfermedades del hígado con dietas no balanceadas, además de proporcionar resultados positivos en tratamientos que representen nuevas opciones terapéuticas para enfermedades hepáticas (Guishuai *et al.*, 2019).

Dentro de los microorganismos utilizados para contrarrestar las enfermedades del hígado, destacan dos géneros de bacterias, el género *Bifidobacterium* y el género *Lactobacillus*. Se ha encontrado que el primero puede proteger y atenuar el daño en el tejido hepático, en un modelo animal administrado con D-galactosamina (Fang *et al.*, 2017).

Otro estudio demostró propiedades anticancerígenas de *Bifidobacterium longum*, al ser modificada genéticamente como sistema de entrega para la producción de endosatin, un antiangiogénico que ayudó a reducir el tamaño de los tumores de hígado en un modelo animal (Feng *et al.*, 2005). También se ha visto una relación entre este género y el aumento de células CD8⁺T, que son una importante herramienta contra patógenos intracelulares, como bacterias o virus, y para la vigilancia de las células tumorales en pacientes con CHC (Rong *et al.*, 2017).

También, se han utilizado mezclas de probióticos de diferentes géneros en modelos animales de daño hepático, donde la inflamación y los niveles de la enzima ALT disminuyen con su administración (Li *et al.*, 2003), de igual forma las células NK (Ma *et al.*, 2008), fibrosis y la atenuación de la acumulación de grasa en el hígado (Velayudham *et al.*, 2009).

La propuesta del uso de probióticos se ha investigado en modelos animales, pero también se han realizado estudios en pacientes con enfermedades hepáticas. En

pacientes con NAFLD, a quienes se les administraron mezclas de cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* durante 12 semanas y se observó una disminución en enzimas ALT, AST (Kiprich *et al.*, 2007; Aller *et al.*, 2011), también mejoró la capacidad fagocítica de neutrófilos y disminuyó la expresión de receptores tipo toll 4 (TLR4) (Staldbauer, 2008).

La administración de probióticos se ha considerado para la mejoría en niños con hígado graso no alcohólico (HGNA) este es un padecimiento para el cual, no hay tratamiento en la población pediátrica, por lo que es una alternativa viable y de bajo costo (Vajro *et al.*, 2011). Estos estudios sugieren que el administrar probióticos se ve influenciado el eje intestino-hígado a través de la vena porta, sin embargo, es necesario el diseño de estudios con que se puedan obtener conclusiones más acertadas para el empleo de estas bacterias benéficas.

Mecanismos de protección mediados por probióticos ante el cáncer

Los mecanismos precisos por los cuales los probióticos pueden inhibir el cáncer son actualmente desconocidos, sin embargo, se sabe que el microambiente del tracto intestinal inhibe el crecimiento de patógenos, mejora la capa mucosa y preserva las células del epitelio intestinal. Estos son mecanismos que disminuyen la hipertensión portal debido a una disminución del lipopolisacárido en el plasma (Wiest *et al.*, 1999).

Datos clínicos interesantes en seres humanos muestran cómo *L. rhamnosus* LC705 y *Propionibacterium freudenreichii* pueden llegar a reducir el efecto de la dosis biológicamente efectiva de una exposición a aflatoxinas causantes del CHC (El-Nezami *et al.*, 2006). Kumar y colaboradores en 2011 estudiaron los cambios en la expresión génica inducidos por *Lactobacillus rhamnosus*, donde los genes asociados al CHC en las ratas tratadas en comparación con el grupo control tienen

una menor expresión, además de que la frecuencia de tumores en el hígado se vio disminuida.

Algunas cepas de probióticos como *L. rhamnosus*, pueden unir satisfactoriamente micotoxinas mediante mecanismos de unión al glutatión, esta unión es catalizada por el glutatión-S-transferasa. Este reporte demostró que la bioabsorción de las micotoxinas y el daño al ADN disminuyeron; por otro lado, se ha demostrado, que cepas como *B. longum* pueden neutralizar aflatoxinas como la AFB1 y AFM1 por un proceso similar (Haskar *et al.*, 2000).

Otros mecanismos utilizados por los probióticos ante el cáncer son:

- La unión de moléculas cancerígenas mediante la conjugación con glutatión.
- Reducción de especies reactivas de oxígeno.
- Unión de moléculas cancerígenas a la pared celular de probióticos como *B. longum* (Orrahge *et al.*, 1994).
- Decremento de enzimas y metabolitos como β -glucosidasa, β -glucuronidasa, nitrato reductasa y amonio.
- Conversión de ácido linoleico a ácido linoleico conjugado con propiedades antitumorales por probióticos (Ewaschuk *et al.*, 2006).
- Modulación del sistema inmune (Bakker-Zierikzee *et al.*, 2006).

Aún así, las evidencias de los efectos de probióticos sobre el desarrollo del CHC aún son pocas, esto debido al complejo desarrollo de la historia natural del cáncer. Dentro de los estudios realizados, ya sea en modelos animales o en pacientes con enfermedades hepáticas, se puede observar el uso común del género *Bifidobacterium*, por lo que representa una oportunidad de profilaxis.

Género *Bifidobacterium*

Las bifidobacterias fueron aisladas por primera vez en 1899 de un lactante sano por Henri Tissier pediatra del Instituto Pasteur en Francia (Turroni, 2017). Los microorganismos del género *Bifidobacterium* son bacilos grampositivos anaerobios y no formadores de esporas, que pertenecen al *phylum Actinobacteria* y originalmente se llamó *Bacillus bifidus communis*, del latín *bifidus*, que significa hendido en dos partes (figura 4). Las principales características fenotípicas del género *Bifidobacterium* son la producción de ácido láctico y ácido acético como los principales productos de la utilización de glucosa (Danisco, 2008).

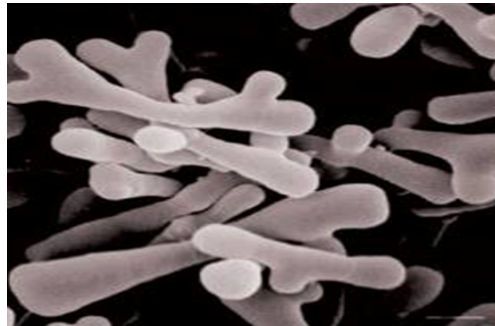


Figura 4.- *Bifidobacterium*, vista con microscopía de barrido donde se observa la bifurcación en su morfología característica de este género. Recuperado de <https://friendlybeast.com>.

Dentro de las propiedades benéficas de *Bifidobacterium* (Picard *et al.*, 2005), se rescatan las siguientes:

- Mejoramiento del tránsito intestinal.
- Producción de ácidos grasos de cadena corta.
- Producción de vitaminas principalmente del complejo B.
- Efectos de barrera.

- Producción de sustancias inhibitorias como bacteriocinas.
- Prevención de infecciones mediante el bloqueo de sitios de adhesión.
- Estimulación del sistema inmune.
- Efectos anticancerígenos.
- Modulación positiva de nitritos, aminos y aminos heterocíclicos.

Algunas de las especies del género *Bifidobacterium*, han sido consideradas como seguras y adecuadas para el consumo humano, *B. longum* es parte de la lista de The inventory of microorganisms with documented history of use in human Food y de la calificación de seguridad por la European Food Safety Authority, así como también es considerada como un microorganismo tipo GRAS (Generally Recognized As Safe) (Fang *et al.*, 2017; Morgensen *et al.*, 2002).

Varias especies de *Bifidobacterium* se incorporan a las preparaciones probióticas en enfermedades hepáticas crónicas, de las cuales se han llevado a cabo algunos estudios que se mencionan en la tabla 1.

Tabla 1.-Tratamiento con probióticos del género *Bifidobacterium* para enfermedades hepáticas.

Bacteria	Propiedad	Referencia
<i>B. longum</i>	Decremento de AST, endotoxinas, y esteatosis.	(Malaguarnera <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. longum</i>	Inhibe la genotoxicidad de dimetilhidrazina (DHM) en ensayos de daño al DNA gastrointestinal.	(Vanderhoof, 2001)
<i>B. pseudocatenulatum</i> LI09 y <i>B. catenulatum</i> LI10	Confiere protección en el hígado, así como reducción el incremento en plasma de M-CSF, MUP-1 α y MPC-1 además de la translocación de bacterias	(Fang <i>et al.</i> , 2017)
VSL#3	Previene la inducción de fibrosis, en un tratamiento por 10 semanas	(Velayudham <i>et al.</i> 2009)
<i>B. lactis</i> <i>B. bifidum</i> SD6576	Reducción de los niveles de ALT, AST en pacientes pediátricos con HGNA	(Famouri <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. longum-reactive</i> <i>Enterococcus hiraereactive</i>	CD8+ T células fueron asociadas positivamente con la libre enfermedad después del tiempo de recesión quirúrgica.	(Rong <i>et al.</i> , 2017)
<i>B. longum</i>	Modificación genética para sistema de entrega del fármaco endosatin	(Feng Fu <i>et al.</i> , 2005).

El uso de *Bifidobacterium*, ya sea sólo o en conjunto con otros probióticos, ha demostrado beneficios en las enfermedades hepáticas (tabla 1). Aunque su modo de acción ante estas enfermedades está muy poco estudiado, se sabe con certeza que mediante la administración de probióticos se estimula selectivamente el crecimiento de bifidobacterias en el tracto digestivo.

Prebióticos

La definición de prebiótico ha cambiado con el tiempo desde su primer concepto en 1921 por Rettger y Cheplin, hasta su actual definición en consenso por *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) que los define como: sustrato que es utilizado selectivamente por microorganismos hospedadores que confieren un beneficio a la salud (Gibson *et al.*, 2017). Este

término abarca no sólo a la microbiota existente en el intestino sino también en otras partes del cuerpo como la piel y la vagina. Para este trabajo nos enfocaremos en la estimulación y alteración de la microbiota intestinal, los prebióticos utilizados para este fin son sustancias de la dieta, no digeribles por enzimas de seres humanos que nutren a ciertos grupos de microorganismos que habitan en el intestino, e inducen el crecimiento de bacterias benéficas como los lactobacilos y las bifidobacterias (Corzo *et al.*, 2015), esto afecta de manera positiva al hospedero dadas las propiedades que ofrecen estos géneros al ambiente intestinal y a la salud del ser humano.

Estos carbohidratos están presentes de forma natural en alimentos como la leche y la miel, así como en hortalizas, verduras, frutas, cereales, legumbres y frutos secos. Se obtienen por extracción directa mediante solubilización en agua o soluciones acuosas (p.ej. inulinas, oligosacáridos de achicoria o soya) y por tratamientos químicos (utilizando álcalis o ácidos) o enzimáticos, por ejemplo, la hidrólisis enzimática de inulina para obtener los fructooligosacáridos (FOS) (Corzo *et al.*, 2015).

Efectos benéficos de los prebióticos

Los prebióticos favorecen la absorción de minerales como el calcio, magnesio, zinc y el hierro, debido a su capacidad de unirse a estos minerales. De este modo, su absorción en el intestino delgado alcanza el colon donde son liberados y posteriormente absorbidos (Manning & Gibson, 2004). Asimismo, contribuyen a la regulación de azúcar en la sangre, el decremento de enzimas como la alaninoamino transferasa en enfermedades del hígado graso, la transformación en ácidos grasos de cadena corta como butirato, propionato, etc. (Corzo *et al.*, 2015). Por lo que, en la actualidad, los consumidores y las organizaciones internacionales han adoptado estrategias con el fin de cambiar costumbres alimentarias y adquirir nuevas, que sean saludables e involucrar valores agregados a los alimentos también llamados alimentos funcionales con el uso de prebióticos (Castillo *et al.*, 2016). La inulina es uno de los principales prebióticos que se utilizan en estos alimentos funcionales, ya

sea como sustituto de grasa, azúcar o modificador de la textura a nivel sensorial y por supuesto como prebiótico (Castillo *et al.*, 2016).

Inulina

La inulina es un prebiótico formado por oligosacáridos y polisacáridos, en los que el grado de polimerización varía de 2 a 65 unidades monoméricas con un valor medio de 10 y con una estructura mayoritaria de glucosa-fructosa (GF_n). También puede contener una cantidad menor de estructuras fructosa-fructosa (FF_n) (figura 5) (Van de Wiele *et al.*, 2006).

El reconocimiento de la inulina como ingrediente tipo GRAS (Generally Recognized as Safe) en la unión americana y como FOSHU (Foods of Specified Health Use) en países como Japón, ha permitido que actualmente se utilice sin restricciones en un gran número de alimentos como yogures, bebidas, barras de cereales, galletas y formando parte de alimentos simbióticos.

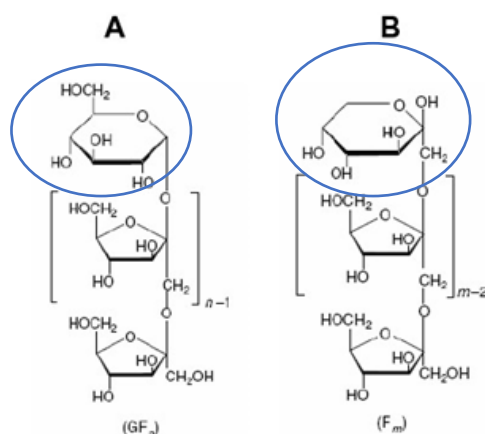


Figura 5.- Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (β -D glucopiranosil) (A), con una molécula terminal de fructosa (β -D fructopiranosil) (B). En los círculos azules se observan las glucosas unidas por los grupos hidroxilo del carbono 1 en posición beta.

La mayoría de los efectos benéficos atribuidos a los prebióticos se asocian con un óptimo metabolismo en el colon, aumento o cambio en la composición de los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), reducción del pH del colon luminal, disminución en los productos finales nitrogenados y enzimas reductoras, mayor expresión de proteínas de unión y de ciertos biomarcadores del metabolismo de lípidos y minerales, así como la modulación del sistema inmune (Kelly, 2009; Qiang *et al.*, 2009).

Los principales beneficios de la inulina están estrechamente ligados con el efecto bifidogénico, ya que se observa un aumento de bifidobacterias que ayudan en la inhibición de cepas bacterianas patógenas, mejora la respuesta inmune, ayuda al metabolismo de lípidos, adsorción de minerales, control de obesidad y desórdenes metabólicos, prevención de cáncer de colon, mejora la motilidad intestinal, capacidad de inhibir acciones enzimáticas bacterianas como las de la β -glucosidasa y la β -glucuronidasa (Verma & Shukla, 2013; Saad *et al.*, 2013; Rasool *et al.*, 2016).

Estos beneficios se ven incrementados cuando el prebiótico y el probiótico trabajan en conjunto formando un complejo simbiótico, que, en este caso, es un efecto específico de la inulina en la estimulación del crecimiento de las bifidobacterias.

Complejo Simbiótico

La microbiota intestinal tiene la propiedad de cambiar su composición mediante la administración de microorganismos como los probióticos o de sustratos como los prebióticos. Los segundos son usados por los microorganismos propios del huésped o que han sido administrados como probióticos en una suplementación dietética o como tratamiento para una enfermedad y de este modo mejorar sus propiedades benéficas. De estas posibilidades de alterar la composición de la microbiota surge el término simbiótico que es definido como “Una mezcla que comprende microorganismos vivos y sustrato (s) utilizados selectivamente por microorganismos hospedadores que confiere un beneficio para la salud del huésped” (Swanson *et al.*,

2020). El uso de una mezcla de probióticos más prebióticos provee ventajas ya que los sustratos están biodisponibles para las bacterias, el efecto benéfico que producen de manera individual se obtiene a concentraciones más bajas de las administradas por separado. En este trabajo se utiliza una mezcla simbiótica que puede ser catalogada por la ISAPP como una mezcla sinérgica simbiótica ya que el prebiótico administrado que en este caso es la inulina es específica para el probiótico coadministrado, las bifidobacterias, ambos componentes cumplen los requisitos establecidos para ser considerados como simbiótico.

Modelos Experimentales

Antes de que nuevos tratamientos sean probados en seres humanos, se deben pasar por fases anteriores mediante el uso de animales de laboratorio, más comúnmente conocida como experimentación preclínica. La interpretación de los resultados y la extrapolación de una especie a otra, dependen del modelo experimental utilizado, la idea es que no existe un modelo perfectamente extrapolable al hombre (Fernández, 2012), por lo que los modelos experimentales son sistemas biológicos que reproducen características fenotípicas, fisiológicas y patológicas del ser humano.

Existen diferentes modelos de hepatocarcinogénesis, entre los que podemos encontrar los modelos de xenoinjertos, que consisten en la inyección subcutánea de células tumorales en un ratón inmunodeprimido, sin embargo, tienen como desventaja que la ausencia de la respuesta inmunitaria del huésped impide evaluar el papel del microambiente que rodea el tumor. Otros modelos son los que utilizan animales modificados genéticamente; sin embargo, estos modelos tienen una complejidad implícita en su desarrollo, su costo es elevado y tiempo de obtención suele ser muy largo. Un tercer modelo de hepatocarcinogénesis es el inducido por carcinógenos; los agentes tóxicos empleados de forma más común para la inducción del CHC son la DEN y la tioacetamida, que pueden ser administrados en conjunto con el tetracloruro de carbono (CCl_4) lo que ha conseguido generar CHC

en el ratón, la rata, el conejo, y otros animales, en un periodo de inducción tumoral relativamente corto que va desde 4 a 12 meses, (Alsinet *et al.*, 2009).

En este trabajo se optó por utilizar un modelo de CHC inducido mediante la administración de un carcinógeno químico, con este modelo el CHC se desarrolla en un periodo de 18 semanas y presenta características muy similares a las que se observan en el ser humano (Schiffer *et al.*, 2005)

El modelo animal de hepatocarcinogénesis de Schiffer

Es un modelo de hepatocarcinogénesis química basado en la exposición crónica de DEN a una dosis de 50 mg/kg vía intraperitoneal, lo que reproduce la progresión del daño hepático crónico a través de las etapas de fibrosis y cirrosis, hasta alcanzar la formación de CHC en un periodo de 18 semanas, que incluyen 16 de tratamiento y 2 de descanso (figura 6), lo cual lo convierte en un modelo muy eficiente si consideramos que en el desarrollo del CHC en el ser humano puede tomar desde 10 hasta 50 años (Schiffer *et al.*, 2005).

En las ratas sometidas a este protocolo de administración de DEN, la cirrosis se desarrolla después de una administración a corto plazo (12 semanas), la cual es evidente en un examen macroscópico del hígado y se ha confirmado por análisis histopatológicos. Por otra parte, los nódulos de CHC surgen a partir de los hígados con cirrosis después de una administración de la DEN por 16 semanas, donde se observaron en la superficie del tejido nódulos malignos, que se manifiestan como lesiones de aspecto dismórfico o discrómico, de diferentes tamaños y son detectados tanto histopatológicamente como con la identificación de marcadores con el uso de marcadores como la proteína gamma glutamil-transferasa, con la cual se pueden distinguir las lesiones preneoplásicas del tejido sano a través de un precipitado que se observa en gradientes de color rojo (Torres *et al.*, 2014)..

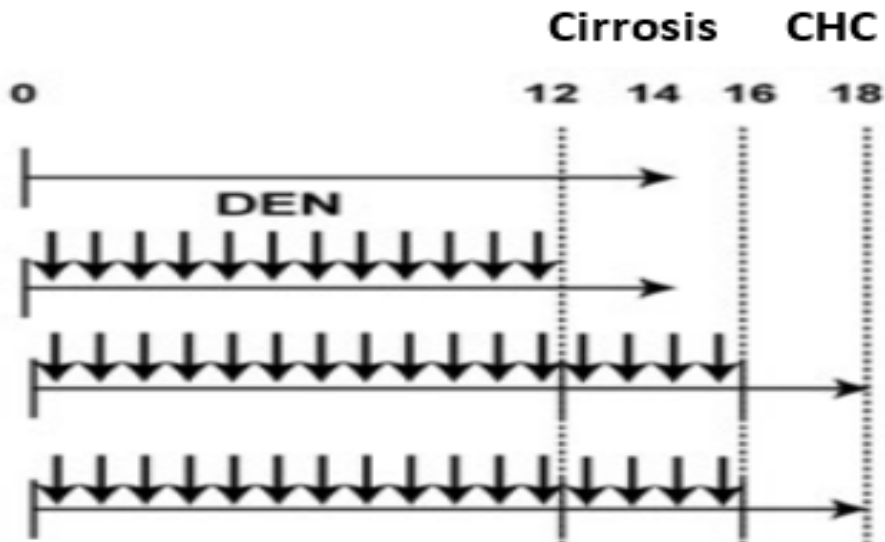


Figura 6.- Diseño experimental del modelo de Schiffer y colaboradores, en el que las flechas verticales representan las inyecciones de DEN vía intraperitoneal y las flechas horizontales representan la evolución de la patología (Schiffer *et al.*, 2005).

Gamma glutamil transferasa

También llamada gamma glutamiltranspeptidasa (GGT), es una glicoproteína heterodimérica unida a la membrana plasmática que desempeña una función fundamental en el metabolismo del glutatión y el transporte de aminoácidos. La actividad de la GGT proviene principalmente del hígado, por lo que es muy utilizada para detectar la disfunción hepática, estrés oxidativo e inflamación (Okada *et al.*, 2006); su expresión distintiva se puede demostrar por histoquímica de la actividad de GGT, usando γ -glutamil-4-metoxi-2-naftilamida (GMNA) como sustrato sintético, glicilglicina como la molécula aceptora y Fast Blue BBN como el cromógeno en una reacción de acoplamiento. La GGT se utiliza como un marcador tumoral en la carcinogénesis hepática experimental en la rata, donde se distinguen focos de hepatocitos alterados, nódulos displásicos y CHC (Torres *et al.*, 2014).

Técnicas histológicas

La histología definida como la ciencia de los tejidos orgánicos es comúnmente considerada como una rama de la biología, que estudia la estructura de los tejidos que constituyen las plantas y los animales. En el campo de la histología se han desarrollado una serie de técnicas que permiten preparar a las muestras para conferirles condiciones óptimas que permitan observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de diferentes tipos de colorantes, ya sean de naturaleza acida o básica que en diversos sistemas de microscopía nos ayuda a observar los tejidos de interés (Salazar & Moreno, 2016).

La mayoría de las células y matrices extracelulares de los tejidos y órganos humanos son incoloras, las características morfológicas de los tejidos de interés pueden ser examinadas con el microscopio óptico cuando son teñidas de forma diferenciada mediante una serie de colorantes. Los colorantes son sustancias capaces de unirse de manera más o menos específica a las estructuras de los tejidos con un color específico, debido a que los tejidos poseen la propiedad de incorporar y fijar sustancias coloreadas.

Generalmente se combina más de un colorante, la tinción de hematoxilina-eosina es la más comúnmente utilizada en histología y es esencial para reconocer diversos tipos de tejidos y cambios morfológicos que forman la base de los diagnósticos médicos.

Tinción de hematoxilina-eosina

La tinción se utiliza rutinariamente en los laboratorios de histopatología, ya que proporciona al patólogo/investigador una visión muy detallada del tejido. Esta información es a menudo suficiente para permitir un diagnóstico de enfermedad basado en la organización de las células y también muestra cualquier anomalía o indicadores particulares en las células.

Se basa en dos etapas, la primera es una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda es una tinción citoplasmática por un colorante ácido, conocido como eosina (figura 7). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo; la hemateína, formada por oxidación de la hematoxilina, se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro que aporta un buen detalle de los mismos. Por tal motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una coloración rosada, para obtener así un buen contraste de las preparaciones microscópicas para facilitar su observación (Santos, 2017).

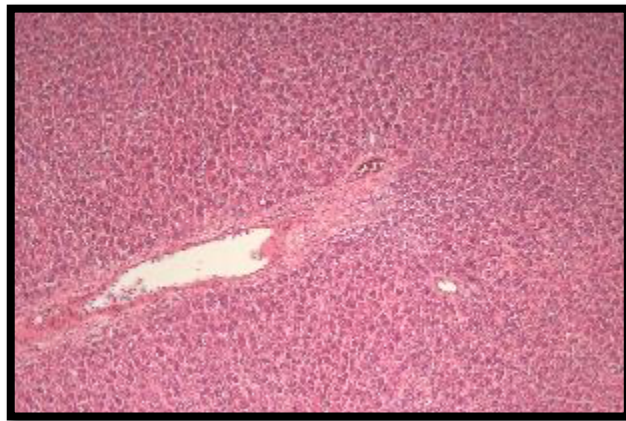


Figura 7.- Sección de corte histológico de hígado, visto con el objetivo 10x en el cual se pueden apreciar los núcleos de color azul (eosina) y el citoplasma de color rosado (hematoxilina).

Tinción tricrómica de Masson

Esta técnica diferencia varias el núcleo, el citoplasma y el tejido conjuntivo de las células mediante tres colorantes distintos (Verdi *et al.*, 2013). El tejido conjuntivo está compuesto por colágeno tipo 1, que con la ayuda de esta técnica, se observa de color azul bajo el lente del microscopio como se muestra en la figura 8. Todas las técnicas para tinción de fibras de colágeno se agrupan clásicamente bajo la

denominación de coloraciones tricrómicas, tiñen el colágeno de tipo I que compone las gruesas fibras de colágeno existentes en los espacios extracelulares.

Las fibras de colágeno son los elementos más frecuentes hallados en el tejido conjuntivo, tienen una función básica de soporte y son sintetizadas por múltiples elementos celulares del organismo, entre los que destacan los fibroblastos, que se encuentran aumentados cuando hay daño en el tejido hepático como la hipertensión portal, que es un elemento principal en el desarrollo del CHC y que rodean a los nódulos hepáticos (Páramo *et al.*, 2010).

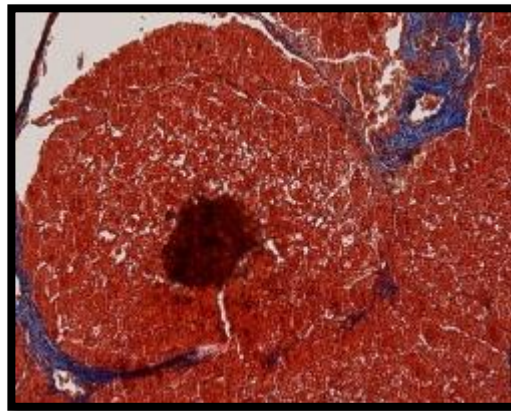


Figura 8.- Corte histológico de un hígado tomado con el objetivo 20x. Se puede observar la formación de fibrosis por colágeno de color azul alrededor de una lesión causada por el carcinógeno DEN.

Planteamiento del problema

El carcinoma hepatocelular es una causa de mortalidad que ocupa el tercer lugar a nivel mundial y su detección se lleva a cabo en etapas avanzadas de su desarrollo donde el índice de mortalidad es de casi el 100 %. Existen nuevas alternativas de profilaxis que incluyen el uso de probióticos, por lo que se propone determinar la influencia de la administración de *Bifidobacterium sp.* en combinación con inulina, en el desarrollo del CHC inducido por un modelo de hepatocarcinogénesis química en la rata.

Hipótesis

Considerando las capacidades hepatoprotectoras de algunos probióticos, la administración de un simbiótico: *Bifidobacterium sp.*, en combinación con inulina, disminuirá la formación de nódulos en el modelo de hepatocarcinogénesis.

Objetivo general

Estudiar el efecto de la administración de bifidobacterias en combinación con un prebiótico en la inducción de nódulos en un modelo de hepatocarcinogénesis química en ratas Wistar.

Objetivos particulares

- Obtener cultivos de *Bifidobacterium* sp., con una alta densidad celular.
- Inducir la hepatocarcinogénesis con el carcinógeno dietil-nitrosamina en animales de experimentación utilizando el modelo de Schiffer.
- Evaluar el efecto de la administración de *Bifidobacterium* sp., sobre el desarrollo de nódulos en el modelo experimental de Schiffer.
- Evaluar el efecto de la administración de inulina sobre el desarrollo de nódulos en el modelo experimental de Schiffer.
- Determinar el número de nódulos positivos al marcador de tumor, GGT, en los tratamientos experimentales.
- Determinar el nivel de daño al tejido hepático causado por el carcinógeno en los animales de experimentación a través de análisis histopatológicos.

Metodología.

Microorganismo, medio y condiciones de cultivo

Se utilizó *Bifidobacterium sp.*, el cual fue cultivado en medio MRS (Difco) con 0.5 % de HCl-Cisteína (MRS-C). Los medios de cultivo se prepararon en condiciones anaerobias inyectando CO₂ puro para desplazar el oxígeno presente, inmediatamente después, los viales se cerraron herméticamente con tapón de hule y arillo de metal, se esterilizaron en una autoclave a 15 lb/in² durante 15 min. Los cultivos se incubaron a 37 °C con una agitación constante de 180 rpm.

Se tomó un vial con el microorganismo conservado a -80 °C, éste se descongeló y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. Para eliminar el exceso de glicerol, el paquete celular se lavó con solución salina fisiológica (SSF) y se resuspendió con 1 mL de medio MRS-C con lo cual se inocularon 40 mL del mismo medio, éste se incubó toda la noche en las condiciones anteriormente descritas. Este cultivo sirvió como inóculo para el estudio.

Preparación de las bacterias para administrar

Se inocularon 200 mL de medio MRS-C con 20 mL del cultivo y se incubó 48 h para obtener una alta densidad celular. El cultivo se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 min a 4 °C y se lavó 2 veces con SSF para después agregar una solución de glicerol al 20 % y se guardó en congelación con la finalidad de conservar la integridad de las bacterias hasta administrar a las ratas. A esta suspensión se le evaluó la viabilidad para calcular la concentración de bacterias a administrar.

Viabilidad de *Bifidobacterium sp.*

La viabilidad del microorganismo se analizó por la técnica de cuenta en placa, para lo cual se realizaron diluciones decimales seriadas en microtubos estériles de 1.5 mL que contenían 900 μ L de SSF y fueron rotulados: $[10^{-1}]$, $[10^{-2}]$, $[10^{-3}]$, $[10^{-4}]$, $[10^{-5}]$, $[10^{-6}]$, $[10^{-7}]$, $[10^{-8}]$. Al primer tubo se agregaron 100 μ L de la muestra a analizar y a partir de éste se inició la dilución seriada hasta el último tubo $[10^{-8}]$.

Se sembraron por triplicado 3 μ L de cada dilución en cajas Petri con medio MRS-C y se incubaron en anaerobiosis en una jarra GasPak® a 37°C durante 72 h. Se contaron las colonias y se calculó la concentración de bifidobacterias para administrar 1×10^9 UFC/rata.

Tratamiento experimental en animales de laboratorio

Se utilizaron 50 ratas Wistar macho, con un peso promedio de 200 g proporcionadas por la UPEAL-X. Los animales se distribuyeron en 6 grupos con $n=6$ cada uno y dos grupos con $n=7$ (tabla 2).

Tabla 2.- Relación, claves y dosis de los grupos experimentales.

Grupo Experimental	Tratamiento	Clave	Dosis	Número de ratas Wistar
1	Sin tratamiento	Ctrl. Neg.	---	6
2	Control Positivo	Ctrl. Pos.	DEN (50 mg/kg)	6
3	Probiótico	Pro	1X10 ⁹ bacterias/rata	6
4	Prebiótico	Pre	Inulina (150 mg/Kg)	6
5	Probiótico más Prebiótico	Pro + Pre	1X10 ⁹ bacterias/rata + Inulina (150 mg/Kg)	7
6	Probiótico más DEN	Pro + DEN	1X10 ⁹ bacterias/rata + DEN (50 mg/kg)	6
7	Prebiótico más DEN	Pre + DEN	Inulina (150 mg/Kg) + DEN (50 mg/kg)	6
8	Probiótico más prebiótico más DEN	Pro + Pre + DEN	1X10 ⁹ bacterias/rata + Inulina (150 mg/Kg) + DEN (50 mg/kg)	7

El tratamiento para inducir CHC correspondió al modelo original de Schiffer, con la administración intraperitoneal de DEN en una dosis de 50 mg/kg por semana (Schiffer *et al.*, 2005). Por otra parte, el tratamiento con probióticos consistió en la administración intragástrica de 0.5 mL a una concentración de 1X10⁹ bacterias cada tercer día con la ayuda de una cánula. La inulina fue administrada de la misma forma que las bacterias (0.5 mL) en una concentración de 150 mg/Kg.

Los animales fueron mantenidos en ciclos diarios de luz/obscuridad de 12 h y temperatura controlada, con alimento y agua esterilizada *ad libitum*. El peso de cada animal fue registrado una vez por semana.

Obtención de las muestras

La eutanasia de las ratas se llevó a cabo a las 18 semanas de tratamiento, mediante la anestesia con la inhalación de isoflurano. Una vez anestesiadas, las ratas fueron disectadas para en primera instancia, obtener muestra de sangre directamente del corazón. Inmediatamente después se obtuvo el hígado, mismo que fue lavado con solución salina fisiológica y posteriormente pesado. Se anotaron las observaciones generales del animal, la apariencia del hígado y su peso.

Posteriormente, el hígado se cortó en pequeños trozos para ser adheridos a un corcho por medio del adherente Tissue Tek®, se congeló inmediatamente en 2-metilbutano y se conservaron a -80 °C. Un trozo de hígado se colocó en una solución de formalina al 4 % para posteriormente ser embebido en parafina en el Laboratorio de Histología del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Histoquímica de la GGT

Para realizar esta prueba, se utilizó el hígado adherido a los corchos, con el cual se realizaron cortes con un grosor de 20 μm en un criostato (Leica, CM 1520). Para determinar las lesiones GGT positivas, el corte histológico se fijó a una laminilla de vidrio con acetona a -20°C durante 5 min. Se adicionó la mezcla de reacción: [glicilglicina, γ -glutamil-4-methoxy-2-naftilamida (GMNA), fast-blue] a la laminilla, incubándola a temperatura ambiente durante 15 minutos, para después agregar CuSO_4 0.1 M, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez llevada a cabo la reacción, las laminillas se escanearon para cuantificar las lesiones en el tejido utilizando el programa Biophotonics Image J.

Hematoxilina y eosina

Esta tinción se llevó a cabo utilizando un corte del tejido embebido en parafina, para lo cual se eliminó la parafina del tejido por calor en una estufa a 60°C y el tejido fue procesado con un protocolo de tinción introduciendo el tejido en hematoxilina/eosina durante 3 o 4 minutos, se realizaron los lavados correspondientes y posteriormente se observaron las laminillas en el microscopio.

Tricrómica de Masson

Se llevó a cabo un proceso de desparafinación en una estufa a 60°C , posteriormente una hidratación con etanol y se agregaron los colorantes hematoxilina de Harris durante 5 minutos, Fucsina de Ponceau por 5 minutos y Orange G durante 5 minutos. Posteriormente se sumergió en azul de anilina por 10 minutos y se lavó con agua y etanol.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de normalidad para los datos con la prueba de Shapiro-Wilks, y se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía así como la prueba de Kruskal-wallis, tomando como variable independiente el tiempo. Y como variables dependientes el peso de la rata, el peso del hígado en relación con el peso de la rata, el número de nódulos, el tamaño del nódulo más grande y el porcentaje de daño total. Se realizaron múltiples comparaciones de todos los grupos experimentales, para determinar las posibles diferencias significativas con la prueba estadística de Tuckey y U de Mann-Whitney con valores de $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) y $P < 0.0001$ (****).

Resultados

Crecimiento bacteriano

La cepa de *Bifidobacterium* sp., fue descongelada a temperatura ambiente y centrifugada, eliminando el sobrenadante; se le realizó tinción de Gram y se observó su morfología en el microscopio. Posteriormente, la cepa fue inoculada en medio MRS-C. El cultivo fue incubado durante 48 horas; para conocer la concentración bacteriana (UFC/mL), se llevaron a cabo diluciones decimales seriadas: $[10^{-1}]$, $[10^{-2}]$, $[10^{-3}]$, $[10^{-4}]$, $[10^{-5}]$, $[10^{-6}]$, $[10^{-7}]$, $[10^{-8}]$, de las cuales fueron inoculados 3 μL en agar MRS con la ayuda de una micropipeta, la placa fue dividida en cuadrantes, como se observa en la figura 9. Para cada experimento, se eligió la dilución donde se podían contar las colonias y se calculó la concentración de bacterias en UFC/mL para la administración de las ratas.

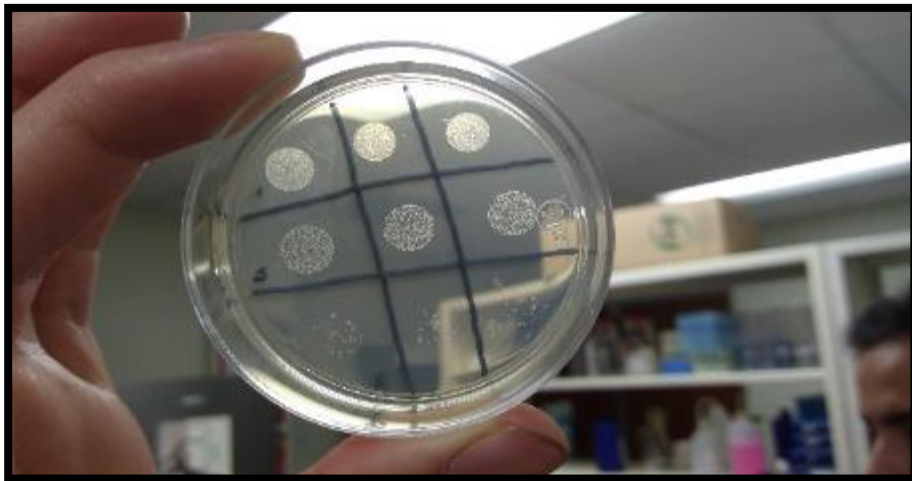


Figura 9.- Caja de Petri dividida por cuadrantes para el conteo de UFC de *Bifidobacterium* sp., en agar MRS.

Tratamiento experimental en animales de laboratorio

El modelo experimental utilizado en este trabajo se basó en la administración de la DEN en una dosis semanal de 50 mg / kg, lo que induce tanto la etilación extensa del ADN del hígado, como la necrosis celular, resultando en la generación de hepatocitos iniciados que eventualmente conducen al CHC (Tolba *et al.*, 2015). Este modelo descrito por Schiffer y colaboradores en el 2005, brinda la ventaja de reproducir la historia natural de daño hepático producido a partir de la aparición de la cirrosis al CHC en un tiempo de 18 semanas, que incluyen 16 de administración y 2 de descanso. Con el propósito de evitar la influencia hormonal del ciclo reproductivo, las ratas que se utilizaron fueron macho, de la clase Wistar, proporcionadas por la UPEAL-X y fueron rotuladas con plumón indeleble en sus colas para ubicar su número, como se muestra en la figura 10.



Figura 10.- Ratas Wistar proporcionadas por UPEAL-X.

Las ratas fueron divididas en grupos experimentales (figura 11) y administradas vía intragástrica con el tratamiento correspondiente, de acuerdo al grupo experimental al que pertenecen.



Figura 11.- Grupos de las ratas tratadas en este trabajo: control negativo (Ctrl. Neg.), probiótico (Pro), prebiótico (Pre), probiótico más prebiótico (Pro + Pre), control positivo (Ctrl. Pos.), probiótico más DEN (Pro + DEN), prebiótico más DEN (Pre + DEN) y probiótico más prebiótico más DEN (Pro + Pre + DEN).

Control de peso semanal de los grupos experimentales

Se llevó a cabo el control de los pesos corporales de las ratas durante el tiempo de la administración, en el que se pesaba a las ratas por grupo con ayuda de una báscula. Se registró su peso semanalmente como se muestra en las figuras 12 y 13.

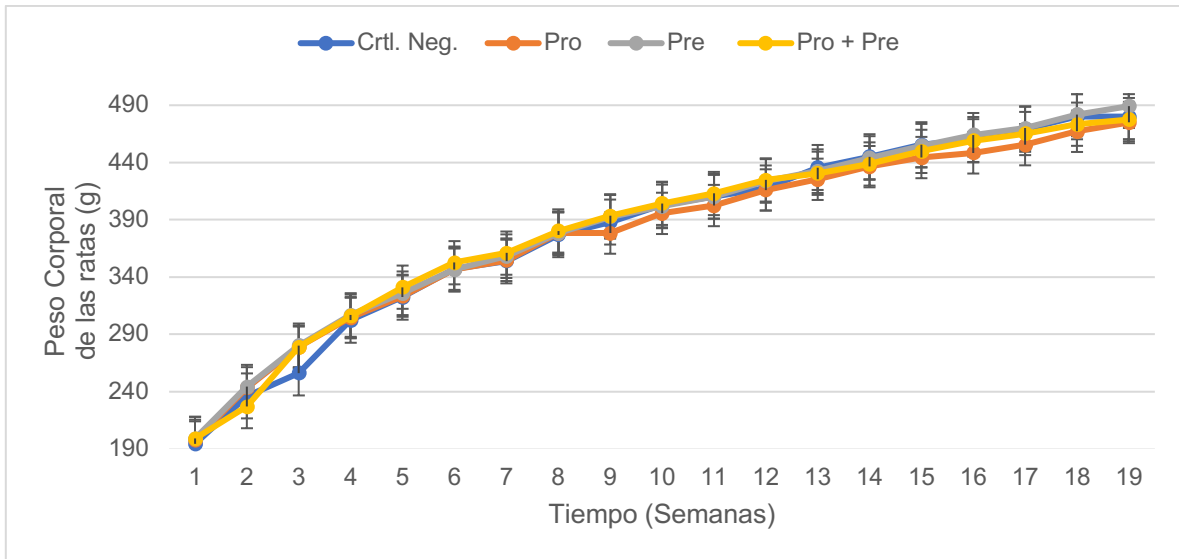


Figura 12.- Pesos de las ratas de los grupos sin carcinógeno durante 18 semanas: control negativo (Ctrl. Neg.), probiótico (Pro), prebiótico (Pre), probiótico más prebiótico (Pro + Pre).

En la figura 12 se puede apreciar que durante las 18 semanas, la variación de peso entre los grupos a los cuales les fue administrado el probiótico, prebiótico y al que no se le administró ningún tipo de tratamiento (Ctrl. Neg.), se observó que no hay una diferencia estadística que indique que la administración de los tratamientos Pro, Pre y Pro + Pre pueda influir en el peso de las ratas. Es de suma importancia en oncología hacer esta referencia al cambio de peso que se ha producido con respecto al habitual, en este caso utilizando como referencia el grupo control y su evolución en el tiempo para poder observar algún trastorno nutricional en la administración de los tratamientos.

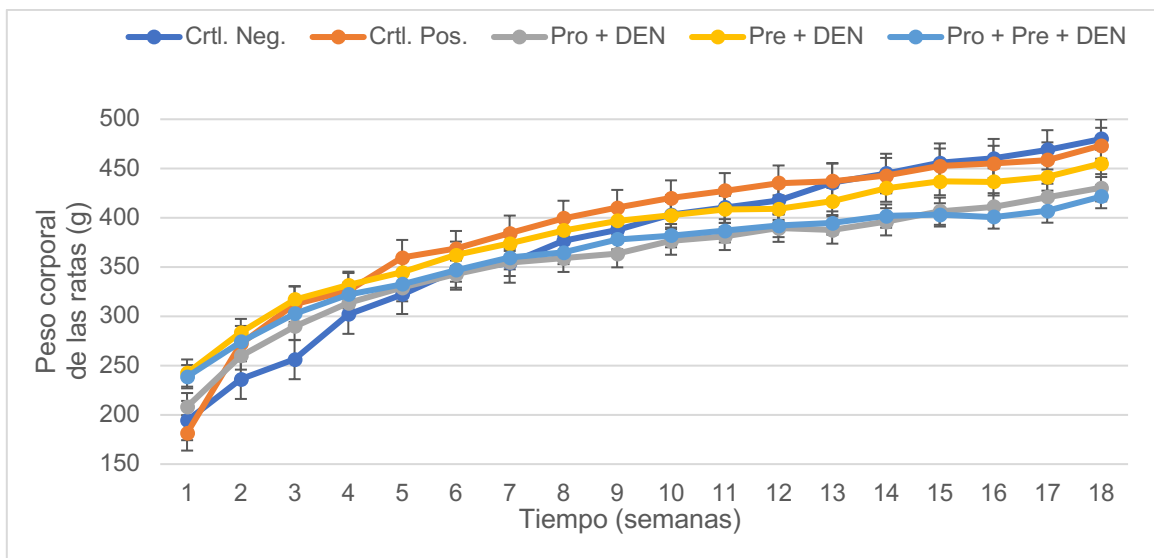


Figura 13.- Pesos de las ratas en los grupos administrados con DEN: Control negativo (Ctrl. Neg.), control positivo (Ctrl. Pos.) probiótico más DEN (Pro + DEN), prebiótico más DEN (Pre + DEN), probiótico más prebiótico más DEN (Pro + Pre + DEN).

La enfermedad y la nutrición están íntimamente relacionadas, de modo tal que, mientras la enfermedad puede causar desnutrición, ésta a su vez, puede influir negativamente en la enfermedad, como se observa en los grupos administrados con DEN que desarrollaron hepatocarcinoma. En la figura 13, los grupos administrados con el carcinógeno a comparación del grupo control negativo, la ganancia del peso corporal al final del tratamiento fue menor, esta tendencia fue mayor en el grupo probiótico más prebiótico más DEN, seguido del grupo prebiótico más DEN.

En el grupo control positivo se puede observar una tendencia similar al grupo control negativo al comienzo de la semana 13 que supera a los demás tratamientos que presentaron disminución de peso, que se puede atribuir al estrés provocado por las diferentes administraciones con cánula que se llevaron a cabo en los demás grupos a los que se les administró los tratamientos, lo que provocó molestias al momento de ingerir su alimento.

Para ello se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) donde no se encontró alguna diferencia estadística significativa, más sin embargo, se observó una tendencia en la disminución de peso en las ratas administradas con DEN, una característica propia del modelo debido a la toxicidad del DEN, el control positivo y

el control negativo presenta un peso similar al final del tratamiento, esta tendencia es atribuida a que la relación del peso del hígado no es la misma en la cual un porcentaje más grande se presentó en el control positivo como se observa en la figura 16.

Observación macroscópica de los hígados

Los hígados fueron extraídos, pesados y observados, se tomó evidencia mediante fotografías. Los hígados fueron previamente etiquetados con el número de la rata, el peso de la rata, el peso del hígado y la fecha de sacrificio.

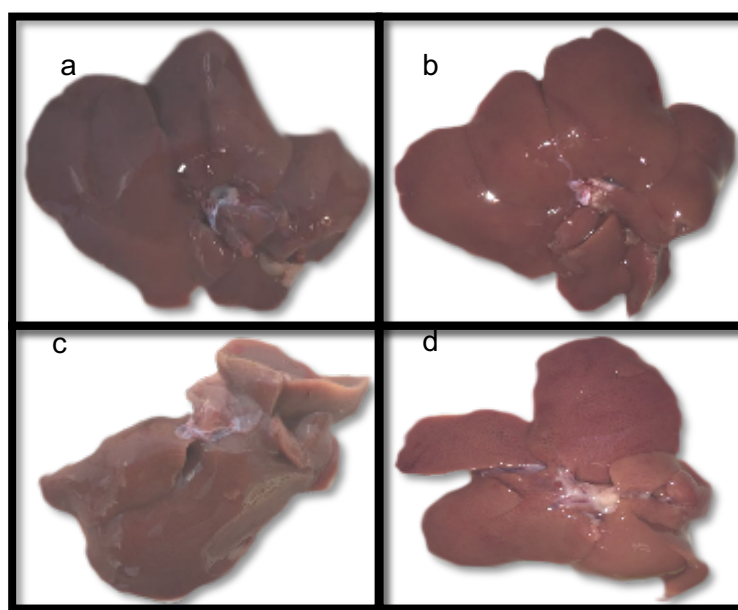


Figura 14.- Representación macroscópica de hígados de los grupos sin carcinógeno: a) control negativo (Ctrl. Neg.), b) probiótico (Pro), c) prebiótico (Pre), d) probiótico más prebiótico (Pro + Pre)

En la figura 14 se observan los hígados pertenecientes a los grupos con tratamiento sin carcinógeno, la apariencia es de hígados sanos con respecto al control negativo, ya que no presentan daño tomando en cuenta el color y textura del tejido que es de un color marrón rojizo con su superficie lisa en contraste con los hígados de los

grupos que fueron administrados con DEN (figura 15), donde se puede observar un tejido de aspecto rugoso con ligera pérdida de color y la formación de tumores y nódulos característicos en el CHC por la administración de DEN. Se observa la presencia de lesiones nodulares en forma de perlas color blanco de diferentes tamaños y también que en comparación con el control positivo (que presentó la lesión más grande), los nódulos en los grupos con el tratamiento son de menor tamaño, además de la apariencia casi normal del tejido en el grupo probiótico más prebiótico más DEN (figura 4d).

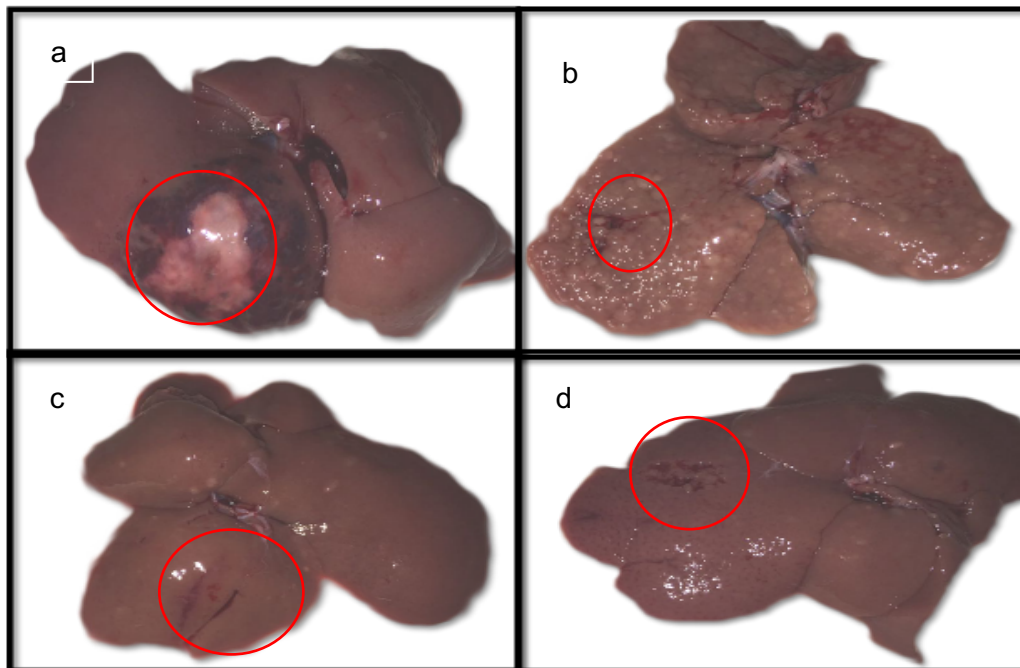


Figura 15- Representación macroscópica de hígados de los grupos administrados con DEN. a) Control positivo (Ctrl. Pos.); b) Probiótico más DEN (Pro + DEN); c) Prebiótico más DEN (Pre + DEN); Probiótico más prebiótico más DEN (Pro + PRE + DEN).

Lo anterior sugiere un efecto preventivo en relación con el desarrollo nodular y la formación de tumores que dañan la función del hígado por la pérdida de tejido sano. Tomando en cuenta que las lesiones hepáticas afectan el peso relativo del hígado, se llevó a cabo un análisis del peso del hígado con relación al peso de la rata por grupo experimental como se muestra en la siguiente sección.

Relación del peso del hígado en relación con el peso de los animales.

Los hígados extraídos de las ratas se pesaron individualmente, se calculó el peso relativo del hígado tomando en cuenta el peso de las ratas en relación con el peso del hígado en forma de porcentaje. Se observaron diferentes tendencias de esta relación de peso en cada grupo, este análisis se representa mediante la siguiente gráfica (figura 16).

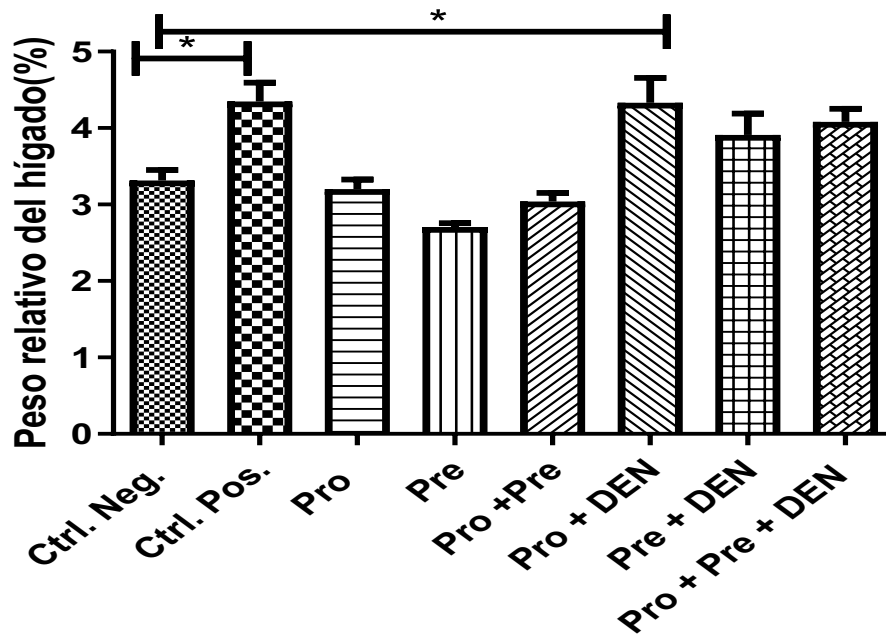


Figura 16.- Medias del peso relativo del hígado de los animales sometidos a los diferentes tratamientos. Control negativo (Ctrl. Neg.), probiótico (Pro), prebiótico (Pre), probiótico más prebiótico (Pro más PRE), control positivo (Ctrl. Pos.), probiótico más DEN (Pro + DEN), prebiótico más DEN (Pre + DEN), probiótico más prebiótico más DEN (Pro + PRE + DEN).

En esta gráfica de barras se muestra la relación de peso del hígado respecto al peso de la rata de cada grupo nombrado mediante la asignación de claves mencionadas anteriormente. Se observa que todos los grupos administrados con el carcinógeno

tienen un mayor porcentaje en comparación con los grupos de tratamiento, tomando en cuenta las gráficas de peso (figuras 12 y 13), las cuales no muestran una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Los resultados indican que el peso de los hígados en los grupos con carcinógeno es más grande a diferencia de los otros grupos. Para determinar un cambio cuantificable se realizó un análisis estadístico (ANOVA) y una prueba *pos hoc* (prueba de Tuckey) para determinar la influencia de los tratamientos. Con los que se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control negativo y control positivo con un valor de $p = 0.0304$., y entre el control negativo y el grupo de probiótico más DEN con un valor de $p < 0.001$, el DEN además de ser un factor principal para el desarrollo de HCC, también tiene implicaciones en el estómago y el colón, este último donde residen las bifidobacterias. Este ambiente de estrés sugiere una disbiosis que conlleva a la permeabilidad de moléculas que producen un daño hepático como los lipopolisacáridos que también provienen también de las bifidobacterias.

Los grupos administrados con DEN mostraron una relación del 4 % de hígado/peso corporal, esto debido a la formación de daño fibrosos y nódulos que se detectó mediante el marcador GGT como se muestra en la figura 17 y a la tendencia de mayor porcentaje solo en los grupos con DEN. En todos los grupos que no llevaron el DEN, se presentó un porcentaje hígado/peso de las ratas menor del 3 %, en los que el grupo administrado exclusivamente con el prebiótico (inulina) presentó la relación más baja de todos los grupos, lo que nos lleva a pensar de las propiedades de la inulina como es la reducción del peso debido la estimulación de la motilidad intestinal así como a la poca bioabsorción de lípidos que son excretados por medio de las heces, también incluye una reducción en el tamaño del hígado como se ha visto en estudios (Kumar *et al.*, 2016). El grupo al que le fue administrado el probiótico y prebiótico + DEN presentó una tendencia promedio y casi similar al mismo grupo sin la administración del carcinógeno, lo que se les atribuye a las propiedades de la mezcla sinérgica simbiótica.

Posteriormente se realizaron cortes histológicos de todos los hígados por cada animal y mediante técnicas histoquímicas como la reacción enzimática de la gama glutamil transferasa, se realizó el análisis que se presenta a continuación.

Histoquímica de la gamma glutamil transferasa

Con los resultados obtenidos se observó macroscópicamente que la influencia de la administración de los tratamientos Pro, Pre y Pro + Pre no generó alguna reacción adversa. Para asegurar que los tratamientos no representan daño al tejido, se analizó la histoquímica de la (GGT, una enzima que se encuentra localizada en la membrana de diferentes células del hígado y funciona como un buen marcador de daño hepático. Este análisis se realizó en cortes histológicos de 20 µm de grosor obtenidos con un criostato, de cada uno de los hígados obtenidos, en las que se llevó a cabo el ensayo de la GGT.

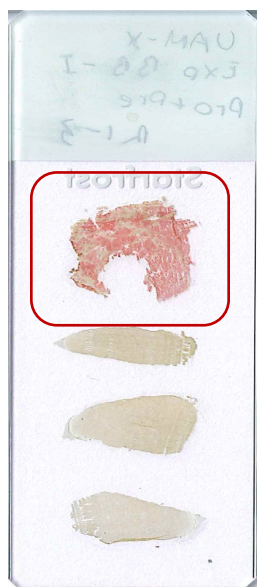


Figura 17.- Laminilla con tres cortes de hígado del grupo: probiótico más prebiótico (Pro + PRE). La parte superior de la laminilla corresponde a una muestra control positivo (Tratamiento con DEN, actividad GGT positiva) encerrada en rojo.

La figura 17 es una imagen representativa de todas las muestras de los grupos sin carcinógeno, representa los cortes de una sección de hígado del grupo Pro + Pre, en la parte superior se encuentra un corte de hígado tratado con DEN como control para asegurar que la reacción enzimática se llevó a cabo. Se puede observar en la laminilla que en los tejidos de hígado de animales con tratamiento y sin DEN no hay un cambio de coloración como en los cortes superiores indicativos de daño al tejido, por lo que los tratamientos no presentaron actividad de la enzima GGT, asegurándonos así, que la administración de probióticos y prebióticos no generaron efectos adversos al tejido hepático.

En la figura 18, se muestra una imagen representativa de la histoquímica de la GGT de los grupos con DEN. Esta figura corresponde al grupo con tratamiento Pro + Pre + DEN, se muestra de color rojo la formación de lesiones y nódulos. Para evaluar cuantitativamente la formación de estos nódulos, se llevó a cabo el análisis mediante un programa informático, que permitió cuantificar el número de nódulos por cm^2 (figura 19), el área total afectada de cada corte, con la obtención del conteo de nódulos totales y la obtención de los diámetros de cada nódulo, se graficaron los datos con ayuda del paquete estadístico Graph Pad Prism como se muestra en las siguientes gráficas.

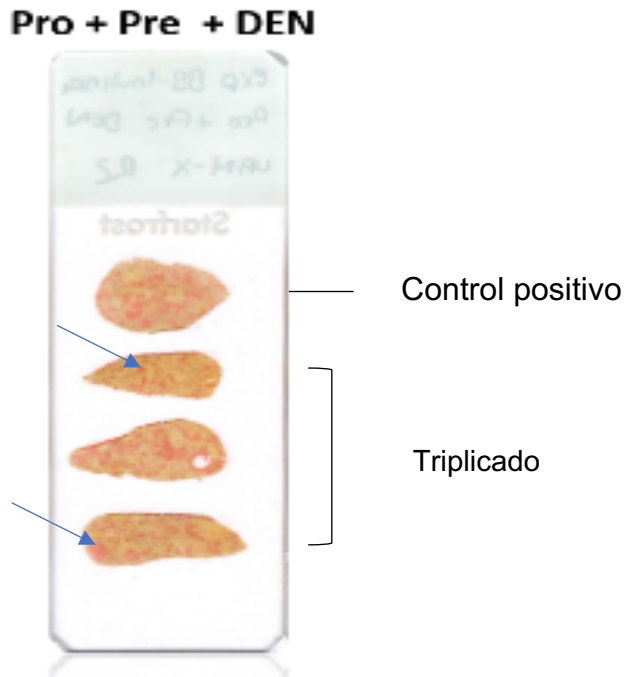


Figura 18.- Histoquímica de GGT en cortes de hígado del grupo Pro + Pre+ DEN. El control positivo corresponde a un corte del grupo DEN.

Los cortes fueron obtenidos de diferentes lóbulos de hígado, mediante la ayuda del micrótopo para poder presentar un análisis integral hepático, por lo que cada corte difería en tamaño y forma.

En la figura 19 se representa el número de nódulos que se encuentra en una zona de 1 cm² por corte, donde el grupo Pro + Pre + DEN presentó el mayor número de nódulos; en contraste del grupo Pre + DEN donde se encontró el menor número de nódulos. Un análisis estadístico permitió encontrar diferencia estadísticamente significativa con valor de $p = 0.001$, para los grupos Pro+Pre + DEN y el grupo Crtl Pos.

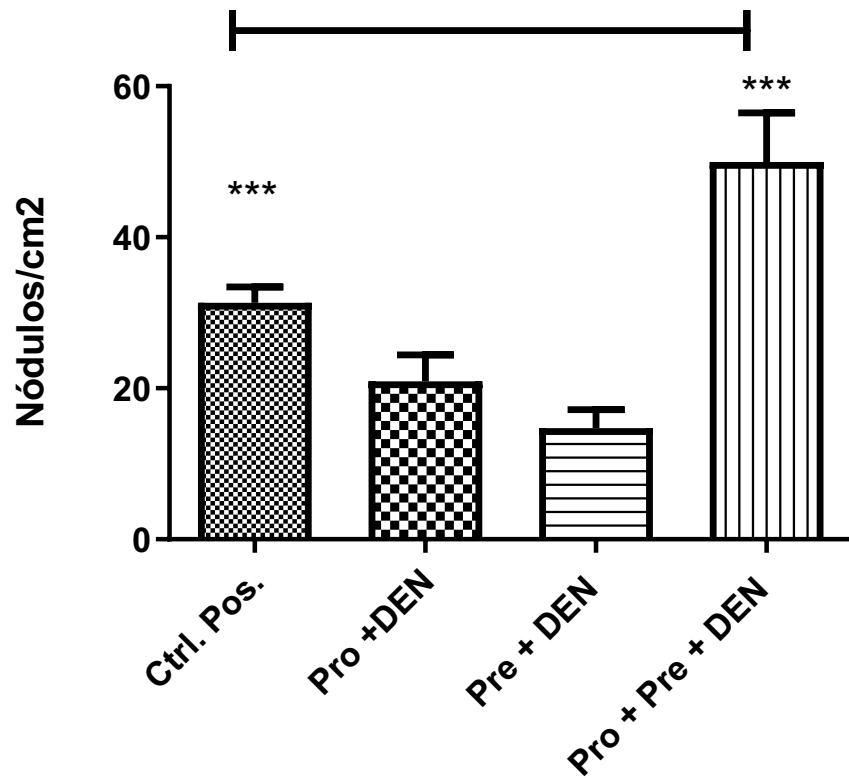


Figura 19.- Número de nódulos por cm². Probiótico más prebiótico más DEN (Pro + Pre + DEN), Probiótico más DEN (Pro + DEN), Prebiótico más DEN (Pre + DEN), Control positivo (Ctrl. Pos.).

Con el uso del programa Image J, fue posible obtener mediante el contraste de coloración, el porcentaje de áreas GGT positivas seleccionadas en cada imagen. En la gráfica siguiente (figura 20) se puede observar el porcentaje total de tejido dañado por área total en cada corte.

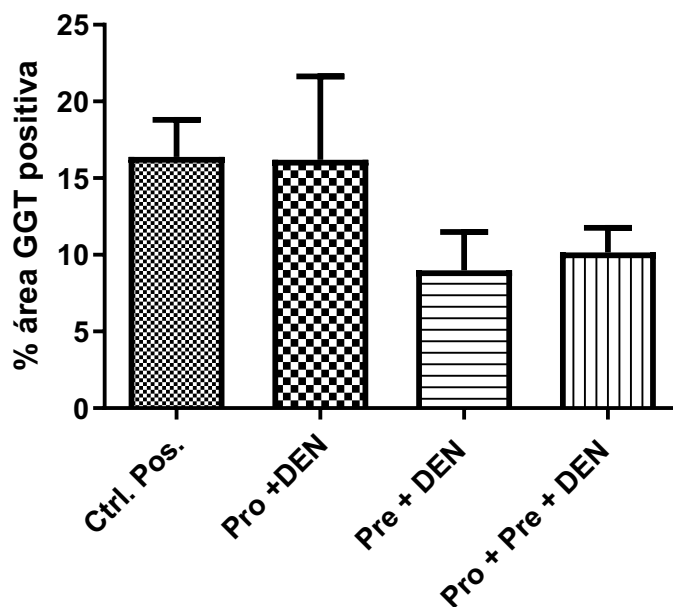


Figura 20.- Porcentaje total de área GGT positiva. a) control positivo (Ctrl. Pos.) b) probiótico más DEN (Pro + DEN), c) prebiótico más DEN (Pre + DEN), probiótico más prebiótico más DEN (Pro + PRE + DEN).

En graficas de la figura 20 se observa que en los grupos Pro + Pre + DEN y Pre + DEN se encuentran por debajo del porcentaje presentado en el control positivo, indicando una tendencia a disminuir el daño causado por el DEN. Esto sugiere un papel muy importante en la administración de inulina, que, aunque no muestra una diferencia estadísticamente significativa, el porcentaje de daño fue menor en comparación con el control positivo.

El tamaño de los nódulos es un factor importante en el desarrollo del CHC, por lo que la influencia del tratamiento en el tamaño del nódulo se presenta en la siguiente gráfica (figura 21):

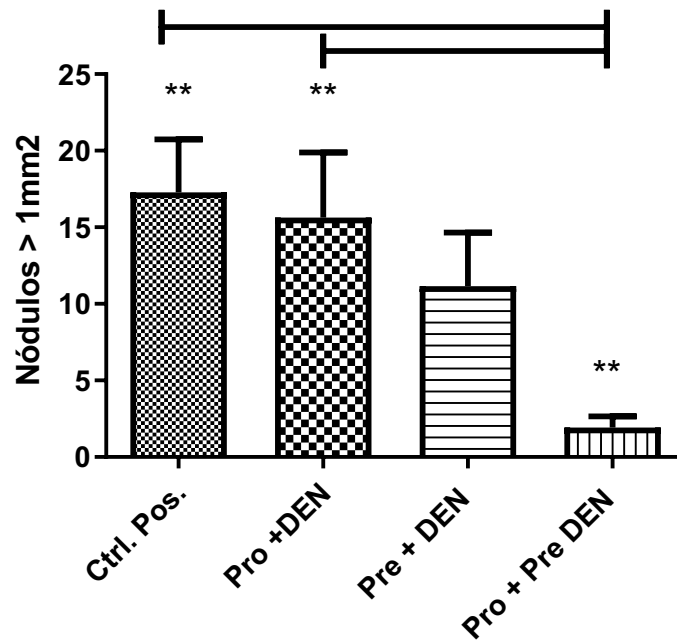


Figura 21.- Nódulos mayores de 1mm²: a) control positivo (Ctrl. Pos.) b) probiótico más DEN (Pro + DEN), c) prebiótico más DEN (Pre + DEN), probiótico más prebiótico más DEN (Pro + PRE + DEN).

En la figura 21 se muestra la cuantificación de todos los nódulos mayores a 1 mm² de cada grupo, el menor número de nódulos se presentó en el grupo Pro + Pre + DEN, en comparación de los demás grupos que incluye el control positivo, mediante la prueba de U de Mann-Whitney se obtuvo un valor de $p = 0.012$, lo que nos indica una diferencia estadísticamente significativa; por lo tanto, la administración del simbiótico reduce el desarrollo del tamaño de los nódulos formados por el carcinógeno en este modelo; el grupo Pro + DEN también presentó diferencia estadística con respecto al grupo Pro + Pre + DEN con un valor de $p = 0.003$, posteriormente se determinó el promedio del tamaño de los nódulos superiores a 1 mm² por grupo como se muestra en la siguiente gráfica (figura 22).

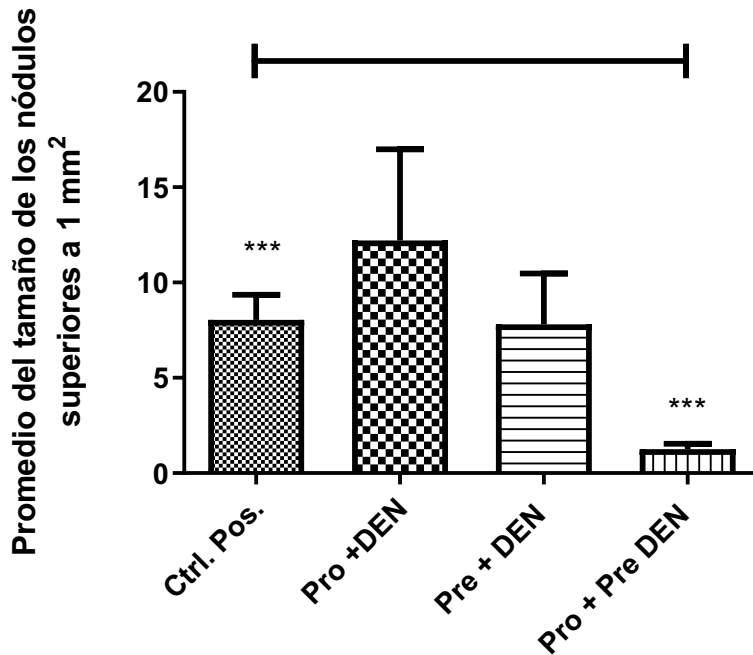


Figura 22.- Tamaño promedio de los nódulos superiores a 1 mm². a) control positivo (Ctrl. Pos.) b) probiótico más DEN (Pro + DEN), c) prebiótico más DEN (Pre + DEN), probiótico más prebiótico más DEN (Pro + PRE + DEN).

Se midió el tamaño de los nódulos y se seleccionaron los de mayor tamaño por grupo, se obtuvo el promedio de estos nódulos y se representan en esta gráfica (figura 22): el grupo Pre + Pro + DEN tiene el menor promedio de nódulos superiores a 1mm², a comparación de los otros grupos Pro+ DEN y Pre DEN; mediante la prueba de U de Mann-Whitney se obtuvo un valor de $p = 0.004$ entre el grupo Ctrl. Pos. y el grupo Pro + Pre DEN lo que nos indica una diferencia estadística significativa, donde el grupo simbiótico tiene el menor porcentaje de nódulos mayores a 1mm², los nódulos del grupo control positivo fueron los más grandes y se podían observar macroscópicamente como se observó anteriormente en la figura 15, pero debido al daño causado al tejido por el DEN, no fue posible fijarlos al portaobjetos para su análisis y ser evaluados, ya que el tejido se desintegraba con la manipulación.

A pesar de que en el tratamiento con el simbiótico se obtuvo un mayor número de nódulos por cm² en comparación con el control positivo, los nódulos desarrollados

en el grupo simbiótico fueron más pequeños, como se muestra en la figura de nódulos/cm². El valor acumulativo del % área GGT positiva en el grupo simbiótico fue 50 % menor que el grupo DEN, que presentan pocos nódulos de gran tamaño.

Para poder observar el daño causado por el carcinógeno en el tejido así como el efecto de la administración de los tratamientos, se realizaron las técnicas de tinción para los tejidos de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson (figuras 23 y 24). La aplicación de estas técnicas histológicas permitió apreciar la estructura del parénquima, así como algunos organelos de las células hepáticas. En las siguientes imágenes se observan cortes de hígado, correspondientes a cada grupo de tratamiento.

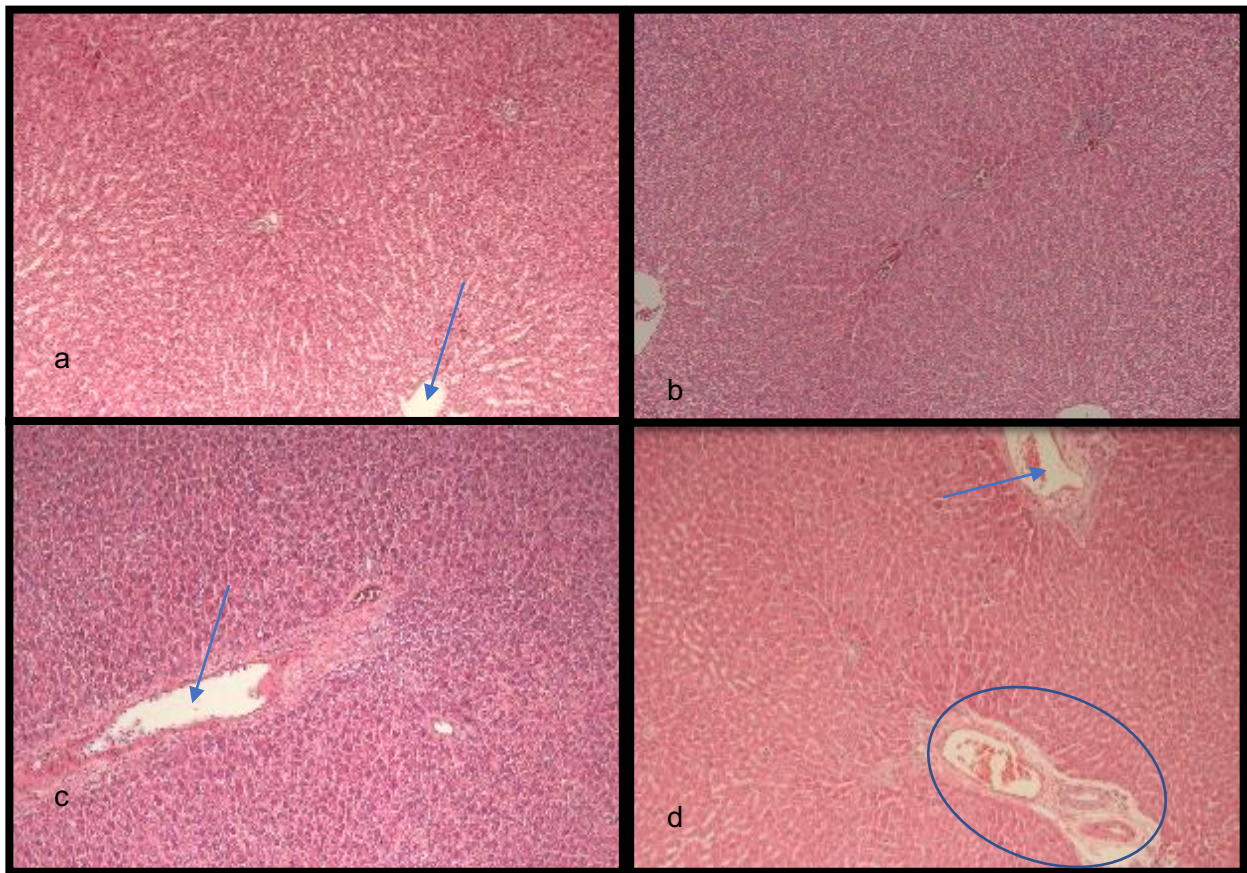


Figura 23.- Cortes histológicos de hígado teñidos con hematoxilina-eosina de los grupos con tratamiento sin carcinógeno, tomadas con el objetivo 10x: a) Ctrl. Neg, b) Pro, c) Pre, d) Pro + Pre.

Las flechas indican las venas centrales, mientras que los círculos indican la arteria, el conducto biliar y la vena porta.

En esta figura se puede observar la estructura del lobulillo hepático (figura 23 a), los hepatocitos, que es la unidad estructural del tejido hepático, se muestran acomodados en formas de hileras sin irrupciones, que rodean a la triada (tracto portal) marcada con un círculo, se le llama comúnmente así al conjunto de los conductos de la arteria hepática, vena porta y conducto biliar.

También se puede observar la vena central marcada con una flecha en las imágenes a, b y d; los núcleos de los hepatocitos están teñidos con azul y el citoplasma de color rosado, estas imágenes pertenecen a los diferentes tratamientos sin la adición de DEN. Todas presentan una estructura similar al grupo control negativo, por lo que los tratamientos no afectan la estructura del tejido hepático.

En la figura 24, se observa la estructura de los hígados en los grupos administrados con DEN, en la imagen a perteneciente al grupo control positivo, se observa una pérdida total de la estructura del tejido hepático que se encuentra alrededor de la vena central marcada con una flecha, esto se debe al crecimiento descontrolado de los hepatocitos. En las imágenes b, c y d de la figura 24, también se observa una disrupción en la estructura del tejido, pero en comparación con el control positivo, es menos marcada, lo que se atribuye al efecto de los tratamientos con probiótico y prebiótico, así como la combinación de ellos. Esta técnica histológica se complementa con la técnica tricrómica de Masson (figuras 25 y 26) para poder observar la formación de colágeno en el tejido hepático.

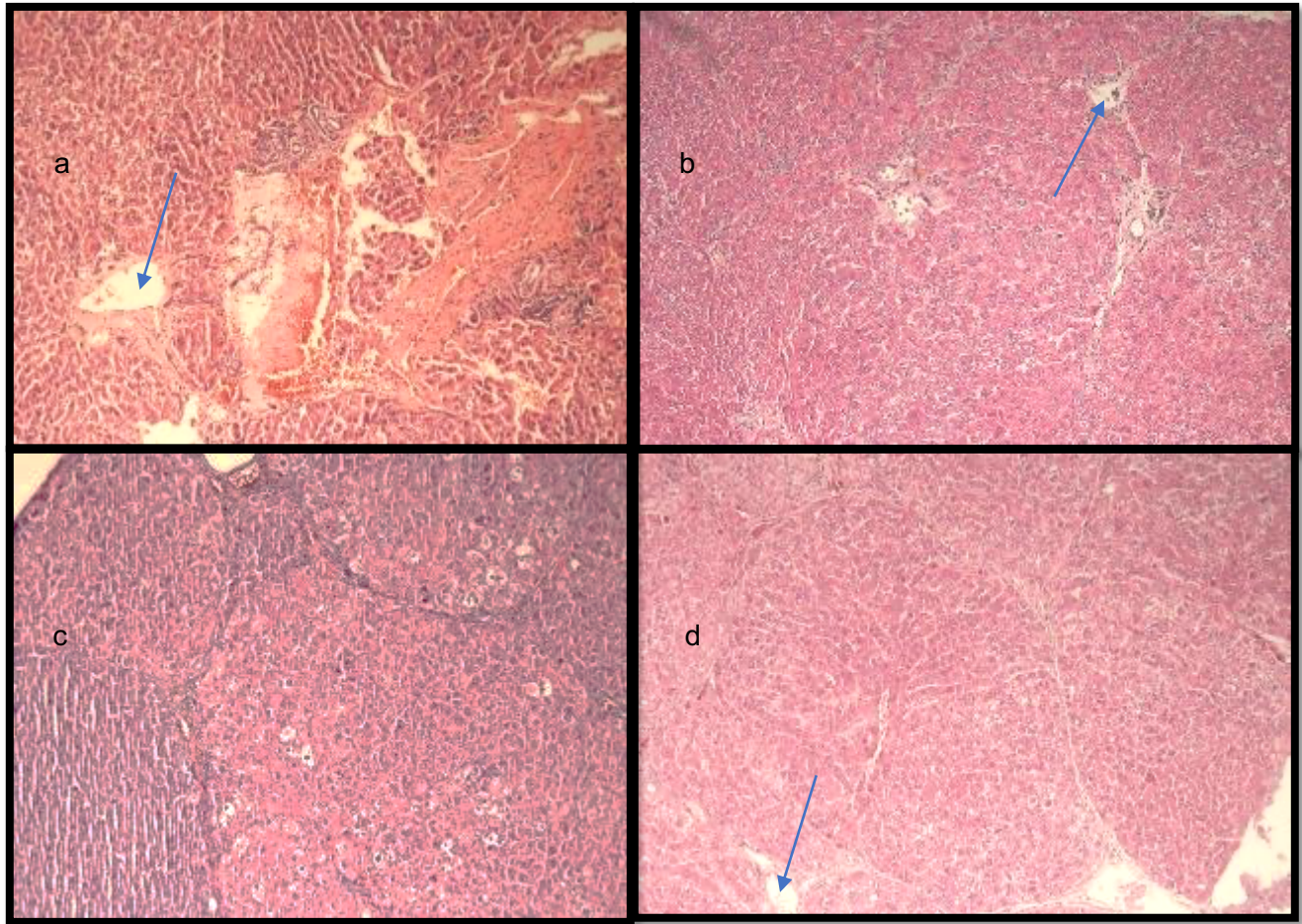


Figura 24.- Cortes histológicos de hígado teñidos con hematoxilina eosina de los grupos con tratamiento y con carcinógeno tomadas con el objetivo 10x. Las flechas indican la vena central a) control positivo, b) probiótico más DEN, c) prebiótico más DEN, d) probiótico más prebiótico más DEN.

Tinción de Masson

En la figura 25 se puede apreciar la estructura del tejido en los grupos experimentales sin la administración del DEN, los tratamientos no muestran daño, se observa una arquitectura normal tomando en cuenta el control negativo. Se señala en círculos la triada y mediante una flecha las venas centrales, este tipo de técnica nos permite además observar de color azul el tejido conjuntivo, que en este caso se ve por la composición de las arterias y venas que están presentes en el lobulillo hepático. Durante la administración del DEN, los tejidos de las siguientes imágenes (Figura 26) se observa una coloración más pronunciada debido a la formación de tejido cicatrizante formado por colágeno tipo 1 que se tiñe de color azul que rodean los hepatocitos dañados que conforman los nódulos, así como el engrosamiento de los conductos del tejido hepático.

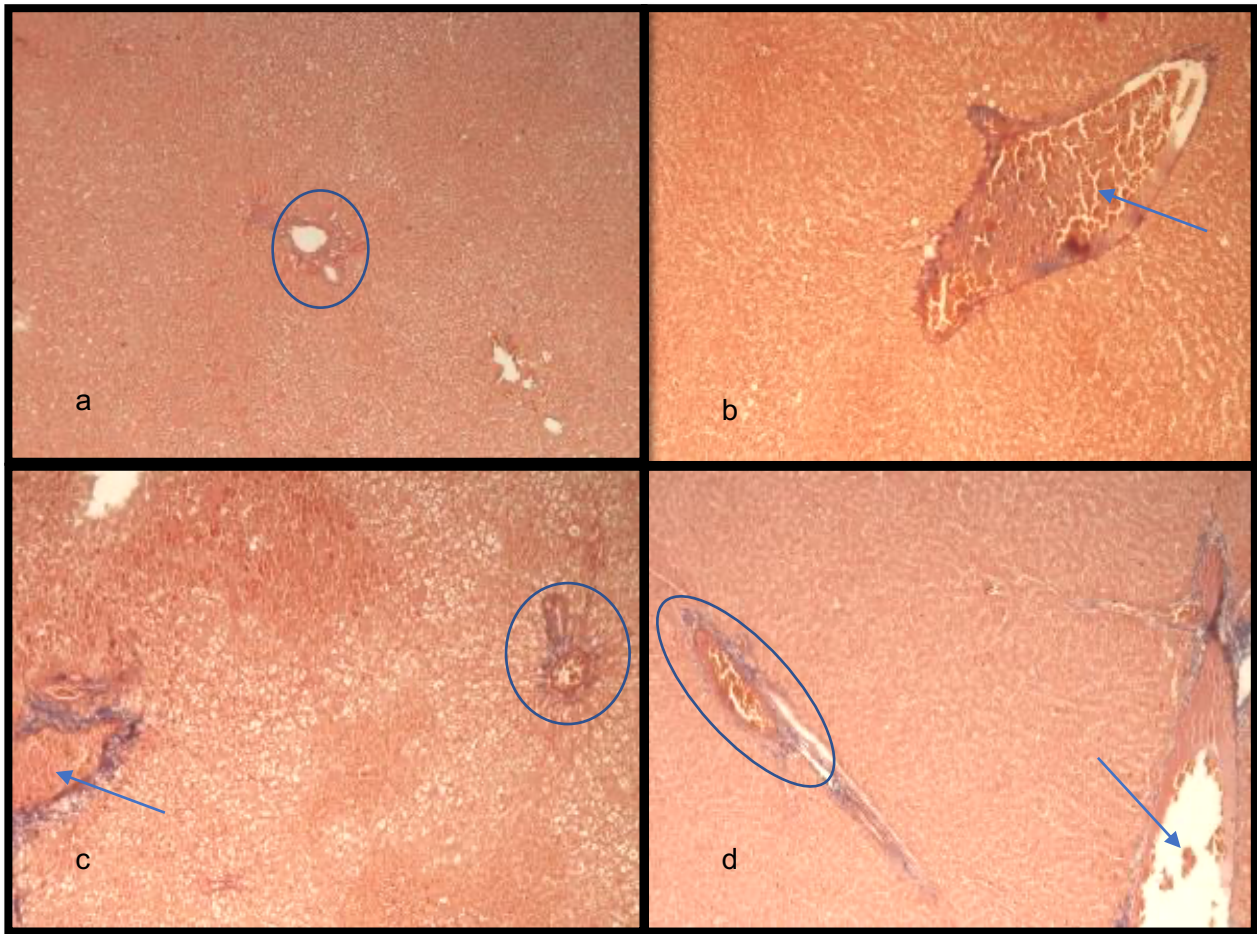


Figura 25.- Tinción de Masson, fotos tomadas con el objetivo 10x. a) Ctrl. Neg. , b) Pro, c) Pre, d) Pro + Pre; las flechas indican las venas centrales mientras que los círculos indican la triada hepática.

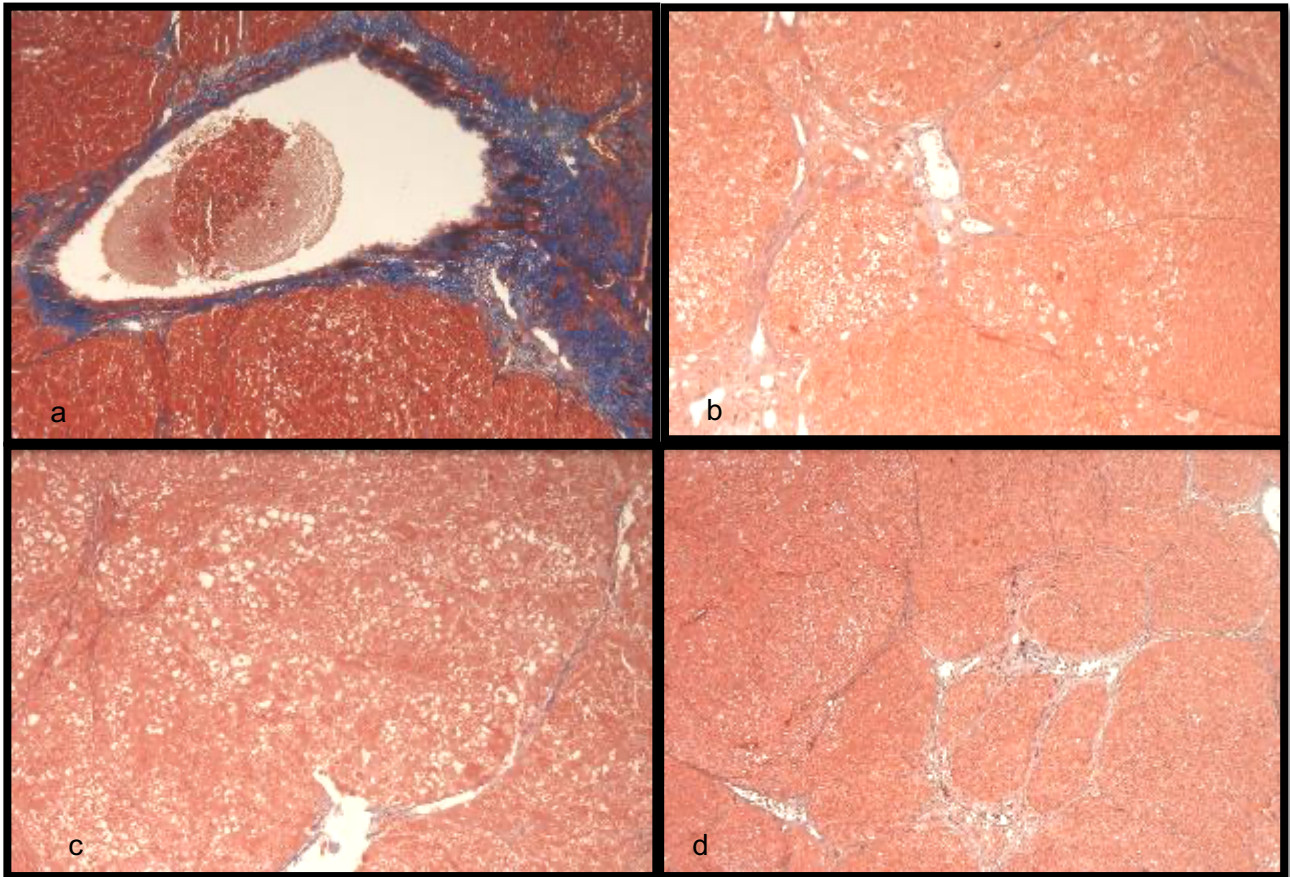


Figura 26- Tinción de Masson, fotos tomadas con el objetivo 10x. a) Ctrl. Pos., b) Pre + DEN, c) Pro + DEN, d) Pro + Pre + DEN.

En la figura 26 se puede observar de color azul, la acumulación de colágeno alrededor de los hepatocitos dañados que forman los nódulos, esta fibrosis es tejido cicatrizante compuesto por colágeno provocado por la administración del carcinógeno DEN. La formación de este tejido es una etapa que precede al desarrollo del hepatocarcinoma. En las figuras b, c y d que representan los distintos tratamientos se puede apreciar una ligera formación de colágeno que rodean los nódulos a comparación del control positivo, por lo que esta diferencia de daño es visible por el tratamiento con DEN y con la administración de bifidobacterias e inulina.

Discusión

La tendencia de la pérdida de peso de las ratas usando el modelo de hepatocarcinogénesis química de Schiffer, fue similar al reportado por otros autores (Limeta, 2014; Martínez, 2014; Molina *et al.*, 2014) donde se observó una disminución de peso en los grupos a los que se les administró DEN.

Así mismo, en los grupos administrados con el carcinógeno DEN, se observó el fenómeno de hepatomegalia descrito por Molina y colaboradores (Molina *et al.*, 2014), a partir de los datos de la relación del peso de los hígados con respecto al peso de las ratas. Esta relación es mayor en los grupos con DEN en comparación con los grupos sin carcinógeno, debido posiblemente al crecimiento descontrolado de células hepáticas, que es una característica de la enfermedad y por lo tanto la formación de nódulos. El menor porcentaje fue representado por el grupo administrado con prebiótico, que es comparable con los datos obtenidos por Amato y colaboradores, en la cual en una dieta adicionada con inulina, se obtenía una relación similar de hígado y peso en cuanto a sus tratamientos (Amato *et al.*, 2017).

Se sabe que la inulina provee un efecto bifidogénico, esto sugiere un papel muy importante en la administración de *Bifidobacterium* adicionado con inulina como ya se ha visto en este trabajo. El tracto gastrointestinal es el órgano inmunitario más grande del cuerpo humano, lugar donde colonizan las bifidobacterias así como el mayor número de células inmunitarias en el cuerpo. Estos microorganismos probióticos son capaces de estimular el sistema inmunitario, más específicamente a los linfocitos CD8+ (Rong *et al.*, 2017), esta clase de linfocitos son llamados citotóxicos y ayudan al organismo eliminando las células que presentan alguna anomalía o infección, en este caso células afectadas por el DEN. Además estimula la producción de linfocitos TCD4 o linfocitos helper y la producción linfocitos natural killer (NK). Los linfocitos de este tipo son especialistas en la destrucción de células cancerosas, tomando en cuenta esto y las etapas del desarrollo del CHC, la acción del tratamiento simbiótico interviene en la fase de promoción del CHC, en la que la producción de estos leucocitos ayudan a destruir la células cancerígenas, producto

de la iniciación mediante la administración del DEN, lo que provocó que el tamaño de los nódulos se disminuyera. Es una posible respuesta a la disminución del tamaño del nódulo y no al número de estos, como se observó en los resultados presentados.

El uso de *bifidobacterium sp.* nos indica que se trabajó con las características propias del género, tomando en cuenta este aspecto, los beneficios que se observaron en el modelo de CHC son atribuidas a una o varias de las 80 especies que se han identificado hasta el momento. Es también una oportunidad para realizar un estudio más detallado tomando en cuenta la identificación por especie de la bacteria como podría ser *Bifidobacterium longum* una de las cuales presenta características más prometedoras en las afecciones del hígado.

El número de nódulos superiores a 1 mm² que presentó el control positivo, superó a los demás tratamientos. Los nódulos de menor tamaño se encontraron en el tratamiento con probiótico más prebiótico (Pro + Pre) y el nódulo más grande se encontró dentro grupo control positivo ya que se podía observar macroscópicamente, en comparación de los que se desarrollaron en los demás grupos. A pesar de que el grupo Pro + Pre + DEN presentó la formación de los nódulos más pequeños, el número de nódulos por cm² fue superior a los demás grupos. Sin embargo, en la cuantificación del área total dañada fue 50 % menor que el control positivo, lo que representa una ventaja tomando en cuenta la agresividad y el periodo de formación del CHC mediante el carcinógeno utilizado.

Gracias a las técnicas histológicas como la tinción tricrómica de Masson, se observó el tejido conectivo y la formación de nódulos, en donde los cortes pertenecientes a los grupos Pro + DEN, Pre + DEN y Pro + PRE DEN mostraron una disrupción de la estructura normal hepática y la formación de tejido cicatrizante mostrado de color azul observándose en menor medida en los tratamientos que en el control positivo. Dentro de esos grupos, el perteneciente al tratamiento con prebiótico fue el grupo con la menor presencia de tejido cicatrizante, esto puede deberse a una menor producción de moléculas que promueven la inflamación, producidas por la presencia de polisacáridos bacterianos, que son capaces de atravesar la barrera

del intestino y llegan al sistema portal dada la condición de las ratas por el DEN. La variación de los distintos cortes por grupo puede atribuirse a una variación que existe en cada individuo, uno de los problemas que hace al cáncer una enfermedad tan variable, así como la búsqueda de nuevas formas de prevenirlo.

Conclusiones

Se obtuvo un cultivo puro de *Bifidobacterium sp.* a una concentración de 1×10^9 UFC/mL. Se corroboró su pureza mediante la tinción de Gram y con ayuda del microscopio se observó su morfología característica del género.

Se observó la formación de nódulos en los hígados de las ratas administradas con el carcinógeno DEN siguiendo el modelo de Schiffer.

La administración del simbiótico (probiótico + prebiótico) mostró un efecto protector para el desarrollo de CHC, los resultados obtenidos en este estudio son satisfactorios tomando en cuenta la agresividad del carcinógeno DEN no así la administración del probiótico o del prebiótico de forma individual.

El ensayo enzimático de la GGT permitió detectar las lesiones en el hígado inducidas con DEN, donde el grupo al que se le administró el tratamiento simbiótico, generó nódulos más pequeños y una menor superficie de daño hepático, por lo que la influencia del tratamiento ayuda de manera positiva en la generación de nódulos preneoplásicos.

Las tinciones histológicas del tejido hepático permitieron observar cambios en la estructura de los lobulillos hepáticos en función de los tratamientos sobre el desarrollo de nódulos hepáticos.

Bibliografía

Abt Michael C, Artis David. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009; 25:496–502.

Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, De La Fuente B, Gonzalez J. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* .2011;15(9): 1090-1095.

Alsinet Clara Armengol, Tovar Victaria Herrador, Villanueva Augusto Rodríguez. Modelos experimentales de hepatocarcinoma. *GH*.2009; 8(2):91-94.

Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Abu-Rajab Tamini T, Feldstein AF, Zein NN. 2010. The Incidence and Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. Pag: 1972-8.

Backhed, Fredrik. Host responses to the human microbiome. *Nutrition Reviews*. 2012:14–17.

Bakker-Zierikzee Astrid Maria, van Tol EAF, Kroes H, Alles Martine, Kok FJ, Bindels JG. Faecal IgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006. 134–140.

Borja Sánchez, Susana Delgado, Aitor Blanco Míguez, Anália Lourenco, Miguel Gueimonde, Abelardo Margolles. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res*.2017; 61 (1): 1-15.

Corzo Nieves, Alonso J.L., Azpiroz F., Calvo M. A., Cirici M., Leis R., Lombó R., Mateos-Aparicio I., Plou F. J., Ruas-Madiedo R., Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion Hospitalaria*. 2015; 31(1): 99-118.

DANISCO. 2008. *Bifidobacterium longum* BI-05, technical memorandum. Pag: 1-3.

El-Nezami, H. S., Polychronaki, N. N., Ma, J., Zhu, H., Ling, W., Salminen, E. K., Juvonen, R. O., Salminen, S. J., Poussa, T., & Mykkanen, H. M. Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *The AMJ Clin Nutr.* 2006; 83(5): 1199–1203

Esposito Emanuela, Iacono Ana, Bianco Giuseppe, Autore Guiuseppina, Cuzzocrea Salvatore, Vajro Pietro, Berni Roberto, Canini Antonio, Meli Rosaria. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *Journal of Nutrition.* 2009; (139 (5):905–11.

Ewaschuk Julia B., Walker Jhon H, Diaz Hugo, Madsen Karen L. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in-vitro and in-vivo in mice. *J Nutr.* 2006; 236 (6): 1483–1487.

Fang Daiqiong, Shi Ding, Lv Longxian, Gu Silan, Wu Wenrui, Chen Yanfei, Guo Jing, Li Ang, Hu Xinjun, Ye Jianzhong, Li Yating. *Biidobacterium pseudocatenulatum* LI09 and *Biidobacterium catenulatum* LI10 attenuate D galactosamine-induced liver injury by modifying the gut microbiota. *Scientific RepoRts.* 2017; 7 (1): 8770

Fasano Alessio, Shea-Donohue Terez. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005; 2(9): 416-422.

Feng Fu Geng, Li Xi, Hou Yi Ya, Fang Yang Rong, Liu Wen-Hua, Xu Gen-Xing. *Bifidobacterium longum* as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid liver cancer. *Cancer Gene Therapy.* 2004; 12: 133-140

Fernandez Monólaco Marcelo. Utilización de Modelos animales en investigación del Cáncer. *Salud Militar.* 2012; 31 (1): 55-58

Gibson Glen R, Hutkings Robert, Sanders Ellen Mary, Prescott Susan L., Reimer Reylene A., Salminen Seppo J, Scott Karen, Satnton Chaterine, Swanson Kelly, Cani Patrice D., Verbeke Kristen, Reid Gregor. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus

statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017; 14: 491–502.

GLOBOCAN. Estimated number of deaths in 2018, Mexico, both sexes, all ages. 2018. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=484&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1

Guishuai Lv, Ningtao Cheng, Hongyang Wang. The Gut Microbiota, Tumorigenesis, and Liver Diseases. *Engineering.* 2017; 3(1): 110–114.

Guyton Artuhur C. *Tratado de fisiología médica.* Editorial: Elsevier España. 2011
Pag: 864. disponible en: <http://www.untumbes.edu.pe/bmedicina/libros/Libros10/libro125.pdf>

Haskard C, Binnion C, Ahokas J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *ChemBiol Interact.* 2000; 128 (1): 39–49.

Javadi, Leila, Khoshbaten Monouchehr, Safaiyan Aabdlrasoul, Ghavami Mostafa, Abbais Mesgari, Gargari Pourghassenm Baharam. Pro- and prebiotic effects on oxidative stress and inflammatory markers in non- alcoholic fatty liver disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2018; 27 (5): 1031–1039.

Jones Sara E, Versalovic James. “Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors,”. *BMC Microbiology.* 2009; 9: 1-9

Kelly Greg, Inulin-Type Prebiotics: A Review (Part 2). *Alternative Medicine Review.* 2009; 14 (1): 38.

Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol induced liver injury: a pilot study. *Alcohol.* 2008; 42 (8): 675-82.

Kumar Manouj, Verma Vinod, Nagpal Ravandier, Kumar Ashok, Gautam Sangeev K, Behare Pradip V. Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB(1)-induced hepatocelular carcinoma. *Gene*. 2011; 490 (1-2):54-59

Kumar Senthil A, Ward Leigh C, Brown Lindsay Inulin oligofructose attenuates metabolic syndrome in high carbohydrate, high-fat diet-fed rats. *British Journal of Nutrition* 2016; (116): 1502–1511.

Lata Jan, Novotny Ivo, Pribramska Veronika, Jurankova Jana, Fric Premysl, Kroupa Radek. The effect of probiotics on gut flora, level of endotoxin and Child-Pugh score in cirrhotic patients: results of a double-blind randomized study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 19 (12): 1111-3.

Li Zhiping, Yang Shiqi, Lin Huizhi, Huang Jiawen, Watkins Paul A, Moser Ann B, Paolella G. 2003. Gut-liver axis and probiotics in NAFLD to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003; 37:343–350.

Limeta Sánchez R.P. Evaluación del efecto en el desarrollo de lesiones preneoplásicas por la administración de bifidobacterias en un modelo de hepatocarcinogénesis en rata Wistar. Universidad Autonoma Metropolitana. 2017: 64-68.

Ma Xiong, Hua Jing, Li Zhiping. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol*.2008; 49 (5): 821-830.

Malaguarnera Mariano, Greco Filippo, Barone Gloria, Gargante Maria Pia, Toscano Maria Antonietta. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharide (FOS) treatment in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Dig Dis Sci*.2007; 59 (11): 3259-65.

Manning TS, Gibson GR. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Prebiotics*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Pag: 287-98.

Marieb EN, Hoehn KN. Human Anatomy & Physiology. 9th ed, Pearson Education, Inc. United States of America, 2013.

Martínez Garcés J.M. Modulación de la expresión de marcadores de inflamación (Tnf α , Ptgs 2, Ilb 1) por ácido fólico y bifidobacterias, en un modelo de hepatocarcinogénesis en rata tratada con dietil-nitrosamina. Universidad Autonoma Metropolitana. 2017: 39-49.

Morgensen G, Salminen S, O'Brien J, Ouwehand AC, Holzapfel W, Short C, Foden R, Miller GD, Donohue D, Playme M, Crittenden R, Salvadori B, Zink R. Inventory of microorganisms with a documented History of safe use in Food. Bulletin of the international dairy federation. 2002; 37: 10-19.

Nava Amapola. Microdissección laser para estudiar cáncer de hígado. Agencia informativa Conacyt. 2017. Recuperado de <http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/salud/15644-microdisseccion-laser-cancer-higado-inmegen>

Øie, Cristina & Mönkemöller, Viola & Hübner, Wolfgang & Schüttpelz, Mark & Mao, Hong & Ahluwalia, Balpreet & Huser, Thomas & Mccourt, Peter. New ways of looking at very small holes - Using optical nanoscopy to visualize liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. Nanophotonics. 2018; 7:2017-0055.

Okada Thoshiro, Suzuki Hideyuki, Wada Kei, Kumagai Hidehiko, Fukuyama Keichi. Crystal structure of the gamma-glutamyltranspeptidase precursor protein from Escherichia coli. Structural changes upon autocatalytic processing and implications for the maturation mechanism. J Bio Chem. 2007; 282 (4): 2433-9.

Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. Mutat Res. 1994; 311(2): 239-248.

Paramo Hernandez B. David, Otero Regino William., Ovalle Pineda Luis F. Fibrogenesis Hepatica. Col Gastroenterol. 2010; 25 (12): 187-192.

Pellicoro Antonella, Ramachandran Prakash, Iredale Jhon P, Fallowfield Janathan A. 2014. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14 (3):181-94.

Polesel J, Zucchetto A, Montella M, Dal Maso L, Crispo A, La Vecchia C, et al. The impact of obesity and diabetes mellitus on the risk of hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol*. 2009; 20 (2): 353-357.

Rasool Qamar Tahir, Syed Fatima, Nasir Mahuammd, Rehman Habib, Nauman Zahid Muhammad, Rui Hai Liu and Sanaullah Iqbal. Novel Combination of Prebiotics Galacto-Oligosaccharides and Inulin-Inhibited Aberrant Crypt Foci Formation and Biomarkers of Colon Cancer in Wistar Rats. *Nutrients*. 2016; 18 (8): 1-14.

Rong Yihui, Dong Zheng, HongZhixian, Jin Yun, Zhang Wei, Zhang Bailong, Mao Wei, Kong Huifang, Wang chumping, Yang Bing, Xudong Gao, Song Zheyu, Green Susan, Song Haihan, Wang Hongbo, Lu Yinying. Reactivity toward *Bifidobacterium longum* and *Enterococcus hirae* demonstrate robust CD8 T cell response and better prognosis in HBVrelated hepatocellular carcinoma. *Experimental Cell Research*.2017; 358: 352-359.

Rousseaux Chisthel, Xavier Thuru, Agathe Gelot, Barnich Niklas, Neut Chirsthel, Dubuguoy Caroline, Emilie Merour, Geboes Karen, Chamillard Mathias, Ouwenhand Greg, Cercano Didier, Colombel Jean-Federic, Ardid Denis Desremaux Pierre. "Lactobacillus aci- dophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors," *Nature Medicine*. 2007; 13 (1): 35– 37.

Saad Naima, Delattre Cedric, Urdaci Maria, Schmitter Jean Marie, Bressollier Philippe. 2013. "An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field," *LWT—Food Science and Technology*. 2013; 50 (1):1–16.

Saier Milton H, Mansour Nahla M . 2005. Probiotics and Prebiotics in Human Health. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005; 10 (1): 22-25.

Salazar Liliana, Moreno Freddy. Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. *Salutem Scientia Spiritus*. 2016; 2 (2): 12-23.

Sanchez Borja, Delgado Susana, Blanco-Minguez Aitor, Laurencio Analia, Gueimode Miguel, Margolles Abelardo. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res*. 2017; 61 (1): 1600240

Santos Vidal Sara. Tincion Hemotoxilina-Eosina. Universidad de Educacion a Distancia (UNED). 2017. 4-16.

Schiffer Eduardo, Housset Chantal, Cacheux Wulfran, Wendum Dominique, Desbois-Mouthon Christele, Rey Colette, Clergue Francois, Poupon Raoul, Barbu Veronique, Rosmorduc Oliver. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*. 2005; 41 (2):307-14.

Sibulesky Lena. Normal Liver Anatomy. *Clinical Liver Disease*. 2012; 2 (1):1-3

Sivan Ayelet, Corrales Leticia, Hubert Nathaniel, Williams Jason, Micheael Aquino Keston, Early M. Zachary, Benjamin W. Franco, Lei Yuk, Jabri Bana, Alegre Maria, Chang Euyene, Gajewzky Thomas. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Researchs Report*. 350 2017; (6264): 1084-1092

Stadlbauer Vanessa, Mookerjee Rajeshwar P, Hodges Stephen, Wright Gaving A, Davies Nathan A, Jalan Rajiv. 2008. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol*. 2008; 48(6): 945-995.

Swanson S. Kelly, Gibson R. Glen, Hutkins Robert, Reimer A. Rayleen, Reid Gregor, Verbeke Kristein, Scott P. Karen, Holscher D. Hannah, Azad B. Megan, Delzenne M Nathalie, Sanders Ellen Marie. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature reviews, Gastroenterology and Hepatology*. 2020; 17:687-701.

The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 11: 506–514.

Torres Mena Julia Esperanza, Sanchez Rodriguez Ricardo, Quintanar Jurado Valeria, Pérez Carreón Julio. Laser capture microdissection after γ -glutamyl transferase histochemistry: An optimization for gene expression analysis. *Analytical Biochemistry.* 2014; 447:126-132

Turróni F., Ribbera A., Foroni E., et al. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality, *Antonie Leeuwenhoek.* 2008; 94:33-50.

Vajro Pietro, Mandato Claudia, Licenziati Maria R, Franzese Adriana, Vitale Dinno F, Lenta Selvagia, Caropreso Maria , Vallone Ginafranco , Meli Rosamaria. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. 2011; 52 (6): 740-743.

Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol.* 2006; 102(2):452-460.

Vandehoof Jon. Probiotics: Future directions. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2001; 73(6): 1152–1155.

Velayudham Arumugam, Dolganiuc Angela, Ellis Michael, Petrasek Jean, Kodys Karen, Mandrekar Pranoti, Szabo Gyongyi. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology.* 2009; 49(3): 989-997.

Verdín Terán Silvia Leticia, Moreno Fierros Leticia, Rojo Botello Norma Rebeca, García Hernández Ana Lilia, Omaña Molina Maritza, Alfredo Meneses Aguirre Alfredo, Nieto Yáñez Oscar de Jesús. *Histología e inmunohistología manual de métodos.* UNAM. 2013: 31-33

Verma Angela, Shukla Geeta. Administration of prebiotic inulin suppresses 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride induced procarcinogenic biomarkers fecal enzymes and preneoplastic lesions in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Journal of Functional Foods*.2013; 5(2): 91–996.

White DL, Kanwal F, Jiao L., Epidemiology of hepatocellular carcinoma. 2016, In: Carr BI, editor. *Hepatocellular carcinoma: Diagnosis and treatment*. Cham: Springer International Publishing.2016; 7(1): 3-24.

Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest*.1999. 104(9):1223-33.

Yan Fang., Hanwei Cao, Timothy Cover, Robert Whitehead, Key Washington, Brent Polk. “Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth,”*Gastroenterology*.2007; 132(2): 562–575.